

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



524971

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. März 2004 (04.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/018688 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82,
9/02

(74) Anwalt: DÖRPER, Thomas; BASF Aktiengesellschaft,
67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009101

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. August 2003 (18.08.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 38 980.2 20. August 2002 (20.08.2002) DE
102 38 979.9 20. August 2002 (20.08.2002) DE
102 58 971.2 16. Dezember 2002 (16.12.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLEBSATTEL, Martin [DE/DE]; Weingarten 9, 06484 Quedlinburg (DE). SAUER, Matt [DE/DE]; Markt 9, 06484 Quedlinburg (DE). FLACHMANN, Ralf [DE/DE]; Halberstädter Str. 20a, 06484 Quedlinburg (DE). SCHOPFER, Christel, Renate [DE/DE]; Konvent 38, 06484 Quedlinburg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF β (B)-CAROTINOIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON β -CAROTINOIDEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of β -carotinoids by the cultivation of genetically-modified plants, the genetically-modified plants and the use thereof as human and animal foodstuffs and for the production of β -carotinoid extracts.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ss-Carotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von ss-Carotinoidextrakten.



WO 2004/018688 A1

Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden

Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von β -Carotinoidextrakten.
- 10 Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. β -Carotinoide, also Carotinoide des β -Carotin-Weges, wie beispielsweise β -Carotin, β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von Mikroorganismen, Algen, Pilzen und Pflanzen als Sekundärmetabolite produziert werden.
- 15 β -Carotin ist eine Vitamin A Vorstufe und damit wichtiger Bestandteil in Food-, Feed- und Kosmetik-Anwendungen. Ferner dient es als Pigmentierstoff in vielen Bereichen, wie beispielsweise in der Getränkemittelindustrie.
- 20 Zeaxanthin ist eines der Hauptpigmente in der Macula des menschlichen Auges und schützt durch sein spezielles Lichtabsorptionsspektrum die empfindlichen Sehzellen. Durch die Lichteinstrahlung wird Zeaxanthin degradiert und muss mit der Nahrung wieder zugeführt werden um einen effizienten Schutz der Macula zu erhalten und Langzeitschäden, wie die altersbedingte Maculadegeneration (ADM), zu vermeiden.
- 25 Ferner dient Zeaxanthin als Pigmentierstoff von Tierprodukten, insbesondere zur Pigmentierung von Eidotter, Haut und Fleisch von Hühnervögeln durch orale Verabreichung.
- Viele β -Carotinoide sind zudem von hohem wirtschaftlichen Interesse, da sie in ihrer
- 30 Eigenschaft als Farbpigmente und Antioxidantien als Nahrungsmittelzusätze, Farbstoffe, Konservierungsstoffe, Futtermittel und Nahrungsergänzungsmittel genutzt werden.
- Die Herstellung von β -Carotinoiden, wie beispielsweise β -Carotin und Zeaxanthin
- 35 erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren.
- Natürliche β -Carotinoide, wie beispielsweise natürliches β -Carotin, werden in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Mikroorganismen, Algen oder Pilzen oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikro-
- 40 organismen und anschließender Isolierung gewonnen.

Natürliches Zeaxanthin ist Bestandteil von sogenanntem Oleoresin, einem Extrakt aus getrockneten Petalen der Pflanze *Tagetes erecta*. Der Gehalt an Zeaxanthin in Oleoresin ist jedoch gering, da die Carotinoide in den Petalen von *Tagetes erecta* zur überwiegenden Mehrheit aus Carotinoiden des α -Carotin-Weges, wie beispielsweise Lutein, bestehen.

Die Erhöhung des β -Carotinoid Gehaltes in Pflanzen bzw. in den entsprechenden Pflanzengeweben ist daher ein wichtiges Ziel der biotechnologischen Optimierung von Pflanzen.

Carlo Rosati et al. beschreiben die Überexpression einer β -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana* mit einem fruchtspezifischen Promoter in Tomate (Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G. Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. Plant J. 2000 Nov;24(3):413-9.). Hierdurch wird das in der Wildtypfrucht vorhandene Lycopin verstärkt in β Carotin überführt.

Sridhar Dharmapuri et al. beschreiben die Überexpression einer β Cyclase und die Kombination mit der Überexpression einer β Hydroxylase in der Frucht von Tomate (Dharmapuri S, Rosati C, Pallara P, Aquilani R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G. Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits, FEBS Lett. 2002 May 22;519(1-3):30-4). Der Gehalt an α Carotinoiden, hier Lutein, ist beziffert. Die Lutein Mengen liegen in allen Fällen zwischen 1,0 und 2,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Frischgewicht (Wildtyp: 1,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$) und der Anteil von Lutein an den Gesamtcarotinoiden beträgt in allen beschriebenen Fällen zwischen 1,4 und 2,9% (Wildtyp: 2,8%). In keiner Frucht dieser transgenen Pflanzen wird der Anteil an Lutein signifikant reduziert.

EP 393690 B1, WO91/13078 A1, EP 735137 A1, EP 747483 A1 und WO 97/36998 A1 beschreiben β -Cyclase-Gene.

EP 393690 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden durch Nutzung mindestens eines der Gene codierend für Phytoen Synthase, Phytoen Dehydrogenase, β -Cyclase und β Hydroxylase erhalten aus *Erwinia uredovora*.

WO91/13078 A1 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden durch Nutzung der Gene ausgewählt aus GGPP-Synthase, Phytoen Synthase, Phytoen Dehydrogenase, β -Cyclase und β Hydroxylase erhalten aus *Erwinia herbicola*.

WO 96/36717 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden durch Nutzung von Genen, codierend für β -Cyclase, erhalten aus *Capsicum annum*.

3

EP 747 483 A1 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden durch Nutzung der Gene codierend für GGPP-Synthase, Phytoen Synthase, Phytoen Dehydrogenase, β -Cyclase und β Hydroxylase erhalten aus Flavobakterium.

- 5 WO 96/28014 beschreibt und beansprucht DNA Sequenzen codierend für eine β Cyclase aus Synechococcus sp. PCC7942, Tabak und Tomate.

- 10 WO 00/08920 beschreibt ein neues β -Cyclase-Gen aus Tomate (Bgene), die Verwendung der Regulationssignale des Bgenes zur chromoplastenspezifischen Expression von Fremdgenen sowie die Verwendung der antisense DNA von Bgene zur Reduktion des β Carotinoid Gehaltes in Tomate. WO 00/08920 beschreibt ferner, dass das Bgene zur Herstellung von Carotinoiden in höheren Pflanzen überexprimiert werden kann.

- 15 WO 00/32788 beschreibt ein Verfahren zur Manipulation des Carotinoidgehaltes in Pflanzen mittels β -Cyclase-Genen aus Marigold. WO 00/32788 beschreibt ferner genetisch veränderte Marigold Pflanzen die eine β -Cyclase überexprimieren. WO 00/32788 beschreibt ferner genetisch veränderte Marigold Pflanzen mit einer reduzierten ϵ -Cyclase Aktivität.

- 20 Alle Verfahren des Standes der Technik liefern zwar teilweise einen höheren Gehalt an β -Carotinoiden am Gesamtcarotinoid-Gehalt, jedoch ohne die Menge an α -Carotinoiden signifikant abzusenken. Das gezielte Absenken des Gehalts an α -Carotinoiden nach den Verfahren des Standes der Technik, wie beispielsweise die Reduzierung der ϵ -Cyclase Aktivität, führt jedoch zu einer Abnahme des Gesamtcarotinoid-Gehalts.

- 25 Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein alternatives Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Pflanzen, die β -Carotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die die geschilderten Nachteile des Standes der Technik
30 nicht aufweisen und einen hohen Gehalt an β -Carotinoiden liefern, bei einer gleichzeitig niedrigeren Menge an α -Carotinoiden.

- 35 Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderten Pflanzen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, aufweisen und die erhöhte β -Cyclase-Aktivität durch eine β -Cyclase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der

Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe, dass Tomate als Pflanze ausgenommen ist.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, verursacht durch eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, in genetisch veränderten Pflanzen mit der Ausnahme von Tomate zu einer Erhöhung des Gehalts an β -Carotinoiden und zu einer Erniedrigung des Gehalts an α -Carotinoiden.

Unter β -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Cyclase verstanden.

Unter einer β -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen β -Ionon-Ring zu überführen.

Insbesondere wird unter einer β -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in γ -Carotin, γ -Carotin in β -Carotin bzw. Lycopin in β -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter β -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin oder γ -Carotin bzw. gebildete Menge γ -Carotin oder β -Carotin verstanden.

Bei einer erhöhten β -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin oder γ -Carotin bzw. gebildete Menge γ -Carotin oder β -Carotin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der β -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der β -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

5

Die Aktivität der β -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stroma-protein von Paprika, NADP⁺, NADPH und ATP zugegeben.

5

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 250 μ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzen-extrakt, 20 nM Lycopin, 250 μ g an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP⁺, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

15 Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sand-mann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

Unter dem Begriff „photosynthetisch inaktive Plastide“ werden Plastide verstanden, in denen keine Photosynthese stattfindet, wie beispielsweise Chromoplasten, Leukoplas-ten oder Amyloplasten.

Dementsprechend werden unter dem Begriff „Pflanzengewebe, enthaltend photosyn-thetisch inaktive Plastide“ Pflanzengewebe oder Pflanzenteile verstanden, die Plastide enthalten, in denen keine Photosynthese stattfindet, also beispielsweise Pflanzen-gewebe oder Pflanzenteile, die Chromoplasten, Leukoplasten oder Amyloplasten 25 enthalten, wie beispielsweise Blüten, Früchte oder Knollen.

In einer nachstehend ausführlich beschriebenen Ausführungsform sind die Pflanzen-gewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, ausgewählt aus der Gruppe Blüte, Frucht und Knolle.

Je nach verwendeter Ausgangspflanze oder entsprechender genetisch veränderter Pflanze weist die Pflanze in dieser bevorzugten Ausführungsform eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Blüten, Früchten oder Knollen im Vergleich zum Wildtyp auf.

35

Dabei ist es vorteilhaft für jede Pflanze das Pflanzegewebe, enthaltend photosynthe-tisch inaktive Plastide, also vorzugsweise Blüte, Frucht oder Knolle, zu wählen in dem im Wildtyp bereits der höchste Gesamtcarotinoid-Gehalt vorliegt.

6

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze verstanden.

5 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze oder beides verstanden werden.

10 Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen die Pflanze oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase Aktivität, für die nachstehend beschriebene Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an β -Carotinoiden jeweils eine Referenzpflanze ver-

15 standen.
Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die als Wildtyp in Blüten den höchsten Gehalt an Carotinoiden aufweisen vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

20 Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die als Wildtyp in Früchten den höchsten Gehalt an Carotinoiden, vorzugsweise Mais.

25 Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die als Wildtyp in Knollen den höchsten Gehalt an Carotinoiden, vorzugsweise *Solanum tuberosum*.

30 Die Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine β -Cyclase gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des β -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder starke Promotoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren kodierend eine β -Cyclase in die Pflanze.

35 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase durch Einbringen von Nukleinsäuren, die β -Cyclasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, in die Pflanze.

In den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres β -Cyclase-Gen unter der Kontrolle eines Promotors, der die Expression des β -Cyclase-Gens in Pflanzengeweben enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide gewährleistet, vor, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. In dieser Ausführungsform weist die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, dementsprechend mindestens eine exogene (=heterologe) β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, auf.

Dazu prinzipiell jedes erfindungsgemäße β -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, codiert verwendet werden.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Bei genomischen β -Cyclase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden β -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, und die entsprechenden β -Cyclasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, sind beispielsweise Sequenzen aus

Tomate (Bgene; WO 00/08920; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2).

Weitere natürliche Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 leicht auffinden.

Weitere natürliche Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Die im folgenden verwendeten Parameter und Bedingungen für Identitätsvergleiche und Hybridisierungstechniken gelten analog auch für alle weiteren, nachstehend beschriebenen Nukleinsäuren und Proteine, die in bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens oder der genetisch veränderten Pflanzen verwendet werden.

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

5

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

- 10 Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

15

Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrill sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

20

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

25

(iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

(iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder

30

(v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder

35

(vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder

(viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder

- (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).

5 (2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

- (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder

- (ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder

10

- (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder

- (iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder

- 15 (v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder

- (vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65 %, vorzugsweise mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 75 %, bevorzugter mindestens 80 %, bevorzugter mindestens 85 %, bevorzugter mindestens 90 %, 25 bevorzugter mindestens 95 %, besonders bevorzugt mindestens 97 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer β -Cyclase aufweist.

30 Dabei kann es sich um eine natürliche β -Cyclase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen oder mit Hybridisierungstechniken aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche β -Cyclase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

35

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, bei-

11

spielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

- 5 Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

10 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

- 15 Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

- 20 Gap penalty 10
Gap length penalty 10

Pairwise alignment parameter:

- 25 K-tuple 1
Gap penalty 3
Window 5
Diagonals saved 5

- 30 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit einer bestimmten Sequenz aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der bestimmten Sequenz insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

- 35 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 60 % aufweist.

12

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze ein.

Alle vorstehend erwähnten β -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann
15 beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in
20 Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Im erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Expression der β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution,
25 Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, unter Kontrolle von Regulationssignalen, vorzugsweise einem Promotor und plastidären Transitpeptiden, die die Expression der β -Cyclase in den Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gewährleisten.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Expressionsrate der β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, aufweisen.
35

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Expression der erfindungsgemäßen β -Cyclase unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors
40 erfolgt.

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Blüten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Expression der erfindungsgemäßen β -Cyclase unter Kontrolle eines blütenspezifischen oder bevorzugter petalenspezifischen Promotors erfolgt.

5

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Früchten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Expression der erfindungsgemäßen β -Cyclase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt.

- 10 Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Knollen erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Expression der erfindungsgemäßen β -Cyclase unter Kontrolle eines knollenspezifischen Promotors erfolgt.

- 15 In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen.

Unter Hydroxylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Carotin-Hydroxylase verstanden, die im folgenden Hydroxylase genannt wird.

- 20 Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

- 25 Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Hydroxyase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin verstanden.

30

Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge β -Carotin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin erhöht.

- 35 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

Unter der nachstehend beschriebenen "endogenen β -Hydroxylase" wird die pflanzen-eigene, endogene Hydroxylase verstanden. Die Bestimmung der Aktivität erfolgt analog.

- 5 Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch ver-änderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 10 Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenex-trakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

- 15 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgen-den Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll bio-synthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (Capsicum annuum L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

- 20 Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in
25 unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

- 30 Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase gegenüber dem Wildtyp.

- 35 Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispiels-weise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens durch Aktivatoren oder durch Ein-bringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien, also durch Einbringen min-destens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase in die Pflanze.

15

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen eigenen, endogenen Hydroxylase verstanden.

- 5 Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.
- 10 Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdsubstanzen erfolgen.
- 15 Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.
- 20 Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

- Bei bestimmten bevorzugten Pflanzen, bei denen der Schwerpunkt der Biosynthese auf dem α -Carotinoid-Weg liegt, wie beispielsweise Pflanzen der Gattung Tagetes, ist es vorteilhaft, die endogene β -Hydroxylase-Aktivität zu reduzieren und die Aktivität von exogenen Hydroxylasen zu erhöhen.
- 25

- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase in die Pflanze.
- 30

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase codiert, verwendet werden.

- 35 Bei genomischen Hydroxylase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.
- 40

Beispiele für ein Hydroxylase-Gene sind:

- 5 eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 3, Protein: SEQ ID NO: 4),

sowie Hydroxylasen der folgenden Accession Nummern:

- 10 lemb|CAB55626.1, CAA70427.1, CAA70888.1, CAB55625.1, AF499108_1, AF315289_1, AF296158_1, AAC49443.1, NP_194300.1, NP_200070.1, AAG10430.1, CAC06712.1, AAM88619.1, CAC95130.1, AAL80006.1, AF162276_1, AAO53295.1, AAN85601.1, CRTZ_ERWHE, CRTZ_PANAN, BAB79605.1, CRTZ_ALCSP, CRTZ_AGRAU, CAB56060.1, ZP_00094836.1, AAC44852.1, BAC77670.1, NP_745389.1, NP_344225.1, NP_849490.1, ZP_00087019.1, NP_503072.1, 15 NP_852012.1, NP_115929.1, ZP_00013255.1

Eine besonders bevorzugte Hydroxylase ist weiterhin die Hydroxylase aus Tomate (Acc.No. LEY14810) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5; Protein: SEQ ID NO. 6).

- 20 In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen vor.

- 25 In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase auf.

- 30 Bevorzugt verwendet man in vorstehend-beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 6, und die die enzymatische Eigenschaft 35 einer Hydroxylase aufweisen.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder

der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 6 leicht auffinden.

- 5 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 5 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 10 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 6.

- 15 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzen-spezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- 20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 5 in den Organismus ein.

- 25 Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

- 30 Vorzugsweise erfolgt die Expression der Hydroxylase im erfindungsgemäßen Verfahren unter Kontrolle von Regulationssignalen, vorzugsweise einem Promotor und plastidären Transitpeptiden, die die Expression der Hydroxylase in den Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gewährleisten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Expressionsrate der Hydroxylase aufweisen.

- 5 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Expression der Hydroxylase unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors erfolgt.

- 10 Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Blüten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die zusätzliche Expression der Hydroxylase unter Kontrolle eines blütenspezifischen oder bevorzugter petalenspezifischen Promotors erfolgt.

- 15 Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Früchten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die zusätzliche Expression der Hydroxylase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt.

- 20 Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Knollen erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die zusätzliche Expression der Hydroxylase unter Kontrolle eines knollenspezifischen Promotors erfolgt.

- 25 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die genetisch veränderten Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe ϵ -Cyclase-Aktivität und endogene β -Hydroxylase Aktivität auf.

- 30 Unter ϵ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer ϵ -Cyclase verstanden.

Unter einer ϵ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen ϵ -Ionon-Ring zu überführen.

- 35 Unter einer ϵ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in δ -Carotin umzuwandeln.

- 40 Dementsprechend wird unter ϵ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge δ -Carotin verstanden.

- Bei einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge δ -Carotin reduziert.

Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

5

Die ϵ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stroma-

10

protein von Paprika, NADP⁺, NADPH und ATP zugegeben werden.

Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

15

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP⁺, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

20

25

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplast, J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

30

Unter endogener β -Hydroxylase -Aktivität wird die Enzymaktivität der endogenen, pflanzeigenen β -Hydroxylase verstanden.

35

Unter einer endogenen β -Hydroxylase wird eine endogene, pflanzeigene Hydroxylase wie vorstehend beschrieben, verstanden. Ist beispielsweise *Tagetes erecta* die genetisch zu verändernde Zielpflanze, so wird unter der endogenen β -Hydroxylase die β -Hydroxylase von *Tagetes erecta* verstanden.

20

Unter einer endogenen β -Hydroxylase wird demnach insbesondere ein pflanzen-eigenes Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter endogener β -Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein endogene β -Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin verstanden.

- 10 Bei einer reduzierten endogenen β -Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die durch das Protein endogene β -Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin reduziert.

- 15 Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die endogenen β -Hydroxylase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

- 20 Es wurde überraschenderweise gefunden, dass es bei Pflanzen die mehrheitlich Carotinoide des α -Carotin-Weges, wie beispielsweise Lutein, herstellen, wie beispielsweise Pflanzen der Gattung Tagetes, vorteilhaft ist, die Aktivität der endogenen β -Hydroxylase zu reduzieren und gegebenenfalls die Aktivität einer heterologen Hydroxylase zu erhöhen. Besonders bevorzugt werden dabei Hydroxylasen oder funktionelle Äquivalente davon verwendet, die aus Pflanzen stammen, die mehrheitlich Carotinoide des β -Carotin-Weges herstellen, wie beispielsweise die vorstehend beschriebene β -Hydroxylase aus Tomate (Nukleinsäure: SEQ ID No. 5, Protein: SEQ ID No. 6).

- 30 Können wir das hier schon antizipieren?

Die Bestimmung der endogenen β -Hydroxylase Aktivität erfolgt wie vorstehend beschrieben analog zur Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität.

- 35 Unter einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität bzw. Hydroxylase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer ϵ -Cyclase bzw. Hydroxylase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

21

Die Reduzierung der erfindungsgemäßen Enzym-Aktivitäten in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der Proteinmenge, oder der mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte Enzym-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der Proteinmenge oder der mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

Eine Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer ϵ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von ϵ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der ϵ -Cyclase). Vorzugsweise wird die ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. die ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder die ϵ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. des ϵ -Cyclase-Proteins oder der ϵ -Cyclase-mRNA).

Eine Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer endogenen β -Hydroxylase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der endogenen β -Hydroxylase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von endogener β -Hydroxylase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der endogenen β -Hydroxylase). Vorzugsweise wird die endogene β -Hydroxylase-Aktivität (bzw. die endogenen β -Hydroxylase-Proteinmenge oder die endogenen β -Hydroxylase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität (bzw. des endogenen β -Hydroxylase-Proteins oder der endogenen β -Hydroxylase-mRNA).

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und/oder der endogenen β -Hydroxylase Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die dsRNA

gegen ein Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,

- 5 b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die antisenseRNA gegen ein Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- 10
- c) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz jeweils kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 15
- d) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-sense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-sense-Ribonukleinsäuresequenz zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 20
- e) Einbringen mindestens eines DNA-oder Protein-bindenden Faktors gegen ein ϵ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein und/oder endogenes β -Hydroxylase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 25
- f) Einbringen mindestens einer den ϵ -Cyclase-RNA und/oder endogenen β -Hydroxylase-RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 30
- g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem ϵ -Cyclase-Gen und/oder endogenem β -Hydroxylase-Gen in Pflanzen. Die Methode umfasst das Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes Gen durch homologe Rekombination oder
- 35

Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen die entsprechenden Gensequenzen generiert werden.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer ϵ -Cyclase und/oder endogenen β -Hydroxylase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase, des Transports der ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase oder deren mRNAs, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines ϵ -Cyclase-RNA bzw. endogenen β -Hydroxylase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

- a) Einbringen einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz (ϵ -Cyclase-dsRNA) bzw. doppelsträngigen endogenen β -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz (endogene β -Hydroxylase-dsRNA)

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Waston und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von

24

doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

5 Unter einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch ϵ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

10 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

15 Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

20 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

25 Unter dem Begriff " ϵ -Cyclase-Transkript" wird der transkribierte Teil eines ϵ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der ϵ -Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

30 Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

35 Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

25

Unter einer doppelsträngigen endogenen β -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch endogene β -Hydroxylase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

5

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder

10

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.

15

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder

20

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.

25

Unter dem Begriff "endogene β -Hydroxylase-Transkript" wird der transkribierte Teil eines endogenen β -Hydroxylase-Gens verstanden, der neben der endogenen β -Hydroxylase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

30

Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der endogenen β -Hydroxylase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

35

Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen endogenen β -Hydroxylase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der dsRNA Teile der Transkripte und/oder Teilsequenzen der Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts bzw. endogenen β -Hydroxylase Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer ϵ -Cyclase bzw. einer endogenen β -Hydroxylase bewirken.

Ein doppelsträngiges RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

Zur Transformation der Pflanze mit einer endogenen β -Hydroxylase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die endogenen β -Hydroxylase-dsRNA transkribiert wird.

27

Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer endogenen β -Hydroxylase (endogenen β -Hydroxylase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA-endogenen β -Hydroxylase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

10

Zur Transformation der Pflanze mit einer endogenen β -Hydroxylase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die endogene β -Hydroxylase-dsRNA transkribiert wird.

- 15 Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

- 20 In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter ϵ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript für die bevorzugte Pflanze *Tagetes erecta* bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 8 oder ein Teil derselben verstanden.

- 25 In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter endogener β -Hydroxylase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript für die bevorzugte Pflanze *Tagetes erecta* bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 16 oder ein Teil derselben verstanden.

- 30 "Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zur Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang des entsprechenden Gens.

35

- Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der Protein Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der
- 40

dsRNA, die ausgehend von der ϵ -Cyclase Sequenz bzw. endogenen β -Hydroxylase-Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die ϵ -Cyclase Expression bzw. endogene β -Hydroxylase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die ϵ -Cyclase-dsRNA

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil der Promotorsequenz eines ϵ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer ϵ -Cyclase für die bevorzugte Pflanze *Tagetes Erecta* eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 9 oder ein Teil der selben verstanden.

Zur Herstellung der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für die bevorzugte Pflanze *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

SEQ ID NO: 10: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der ϵ -Cyclase

SEQ ID NO: 11: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der ϵ -Cyclase

SEQ ID NO: 12: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase

SEQ ID NO: 13: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase

SEQ ID NO: 14: Sense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors

SEQ ID NO: 15: Antisense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die endogene β -Hydroxylase-dsRNA

5

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil der Promotorsequenz eines endogenen β -Hydroxylase-Gens, und
- 10 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

Zur Herstellung der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase -Aktivität werden, insbesondere für die bevorzugte

15 Pflanze *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

SEQ ID NO: 18: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der endogenen β -Hydroxylase

20

SEQ ID NO: 19: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der endogenen β -Hydroxylase

- Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen.
- 25 Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

- Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.
- 30

- Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des
- 35
- 40

ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

5 Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

10 Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz eines Enzyms gerichtet, so umfasst sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreading").

15 Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- 15 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- 20 b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- 25 c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

30 Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

40 Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer ϵ -Cyclase -dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor inseriert und mit den unten

beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-antisenseRNA) bzw. einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer endogenen β -Hydroxylase (endogene β -Hydroxylase-antisenseRNA)

Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430).

Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für die zu vermindernende ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation der ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase unterdrückt.

Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

Eine ϵ -Cyclase-antisense-RNA kann unter Verwendung der für diese ϵ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 7 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der ϵ -Cyclase komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die ϵ -Cyclase umfasst.

Eine endogene β -Hydroxylase-antisense-RNA kann unter Verwendung der für diese endogene β -Hydroxylase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 16 nach den Basenpaarregeln von Watson

und Crick abgeleitet werden. Die endogene β -Hydroxylase -antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der endogene β -Hydroxylase komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die endogene β -Hydroxylase umfasst.

Die antisenseRNAs können eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. Die antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Expressionskassetten enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für zumindest einen Teil einer ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase, wobei besagte Nukleinsäuresequenz mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor in antisense-Orientierung funktionell verknüpft ist.

Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformationskonstruktes oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines ϵ -Cyclase-Gens bzw. endogenen β -Hydroxylase-Gens (z.B. Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des ϵ -Cyclase-Gens bzw. endogenen β -Hydroxylase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807- 815).

In einer weiteren Ausführungsform kann die antisenseRNA eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen, - im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641).

- c) Einbringen einer ϵ -Cyclase-antisenseRNA bzw. endogene β -Hydroxylase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591); Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591; Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338).

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu vermindern- den ϵ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden ϵ -Cyclases aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase bzw. endogener β -Hydroxylase (ϵ -Cyclase-senseRNA bzw. endogene β -Hydroxylase-senseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

- 5 Die Expression einer ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz bzw. endogenen β -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden ϵ -Cyclase-Gens bzw. endogenen β -Hydroxylase-Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen Gen kann die Expression desselben vermindern oder
- 10 ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindern, homologe Gen ganz oder nur teilweise
- 15 repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; in US 5,034,323.

Bevorzugt wird die Kosuppression für die besonders bevorzugte Pflanze *Tagetes erecta* unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu

20 zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 7 bzw. SEQ. ID. NO. 16.

25 Bevorzugt ist die senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation des entsprechenden Proteins oder eines Teils desselben kommen kann. Dazu kann beispielsweise der 5'-untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

- 30 e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen ϵ -Cyclase Gene, -RNAs oder Proteine bzw, gegen endogene β -Hydroxylase-Gene, RNAs oder Proteine

Eine Verminderung einer ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase Expression ist

35 auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Verminderung der Expression. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol

40 Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR

- et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) *J Biol Chem* 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) *Curr Opin Chem Biol* 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) *J Biol Chem* 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25):14628- 14633; Kim JS et al. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8):3616 -3620; Klug A (1999) *J Mol Biol* 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) *Adv Drug Deliv Rev* 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) *Int J Biochem Cell Biol* 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) *J Biol Chem* 275(43):33850-33860).
- 10 Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines ϵ -Cyclase-Gens bzw. endogenen β -Hydroxylase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen.
- 15 Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase selber inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) *Curr Top Microbiol Immunol* 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben (Owen M et al. (1992) *Biotechnology* (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8(4):411-416; Whitelam (1996) *Trend Plant Sci* 1:286-272).
- 20
- f) Einbringen von den ϵ -Cyclase RNA-Abbau bzw. endogenen β -Hydroxylase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressions-
- 25 konstrukt
- Die ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon; Angell SM et al. (1999) *Plant J* 20(3):357-362)
- 30 realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem Transkript einer zu reduzierenden Enzymaktivität mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein.
- Die Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmecha-
- 35 nismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) *Plant J* 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) *Plant Mol Biol* 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) *Plant Cell* 10(6):937-46).

Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine ϵ -Cyclase bzw. eine endogene β -Hydroxylase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 7 bzw. 16.

5

g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktionsverlustes oder einer Funktionsminderung an ϵ -Cyclase-Genen bzw. endogenen β -Hydroxylase-Genen

- 10 Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische Sequenzen gezielt modifiziert werden können. Dazu zählen insbesondere Verfahren wie die Erzeugung von Knockout-Mutanten mittels gezielter homologen Rekombination z.B. durch Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc. (Hohn B und Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323) oder die gezielte Deletion
- 15 oder Inversion von Sequenzen mittels z.B. sequenzspezifischer Rekombinasen oder Nukleasen (s.u.).

Die Verminderung der Enzym-Menge, -Funktion und/oder -Aktivität kann auch durch eine gezielte Insertion von Nukleinsäuresequenzen (z.B. der im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Sequenz

20 kodierend für eine ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase (z.B. mittels intermolekularer homologer Rekombination) realisiert werden. Im Rahmen dieser Ausführungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-Konstrukt, das zumindest einen Teil der Sequenz eines ϵ -Cyclasegens bzw. endogenen β -Hydroxylasegens oder benachbarter Sequenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt rekombinieren

25 kann, so dass durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids das ϵ -Cyclase-Gen bzw. endogene β -Hydroxylase-Gen so verändert wird, dass die Funktionalität des Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird.

- 30 Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) der Gene betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und reduziert wird. Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert,
- 35 die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des ϵ -Cyclase-Gens bzw. endogenen β -Hydroxylase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA
- 40 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem

Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inaktivierten ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase selektioniert.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch
10 die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruches und damit die Effizienz der Deletion der Transgen-sequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei
15 zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidiny)]butoxy]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00/26192, WO 00/29384, WO 00/32579, WO 00/64878, WO 00/68206, WO 00/67734, WO 01/23386 und
20 WO 01/23390 beschriebenen Substanzen.

Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder
25 die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
35 oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder
- b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

5

Vorzugsweise erfolgt die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen im erfindungsgemäßen Verfahren unter Kontrolle von Regulationssignalen, vorzugsweise einem Promotor und plastidären Transitpeptiden, die die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen in den Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive

10

Plastide, gewährleisten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Transkriptionsrate der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen aufweisen.

15

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors erfolgt.

20

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Blüten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen oder bevorzugter petalenspezifischen Promotors erfolgt.

25

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Früchten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt.

30

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Knollen erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines knollenspezifischen Promotors erfolgt.

35

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen endogenen β -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder

- b) Einbringen mindestens einer endogenen β -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.

5 In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen endogenen β -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

10

Vorzugsweise erfolgt die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen im erfindungsgemäßen Verfahren unter Kontrolle von Regulationssignalen, vorzugsweise einem Promotor und plastidären Transitpeptiden, die die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen in den Pflanzengeweben, ent-

15

haltend photosynthetisch inaktive Plastide, gewährleisten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Transkriptionsrate der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-

20

Sequenzen aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors erfolgt.

25

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Blüten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen oder bevorzugter petalenspezifischen Promotors erfolgt.

30

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Früchten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt.

35

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Knollen erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines knollenspezifischen Promotors erfolgt.

40

Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Pflanzen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 5 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

- genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte, endogene β -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,
- 10

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

- 15 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität, eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte, endogene β -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 20 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte, endogene β -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte, endogene β -Hydroxylase-Aktivität aufweisen.
- 25

- Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.
- 30

- Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, ein Ernten der Pflanzen und die Isolierung der β -Carotinoide aus den Pflanzen oder den Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, angeschlossen.
- 35

- Die transgenen Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.
- 40

Die Isolierung von β -Carotinoiden aus den geernteten Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, wie beispielsweise Blüten, Früchten oder Knollen erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von β -Carotinoiden aus den Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, wie beispielsweise Blüten, Früchten oder Knollen erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

Weitere Isolierverfahren von β -Carotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.

Vorzugsweise sind die β -Carotinoide ausgewählt aus der Gruppe β -Carotin, β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin.

Bevorzugte β -Carotinoide sind β -Carotin und Zeaxanthin, besonders bevorzugt Zeaxanthin.

Vorzugsweise sind die Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, ausgewählt aus der Gruppe Blüte, Frucht und Knolle.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man als genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Blüten aufweist, eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae.

Besonders bevorzugt sind Pflanzen, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Calendula officinalis, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum,

- Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hisbiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, 5 Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Solanum tuberosum, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

- 10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man als genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Früchten aufweisen, eine Pflanze ausgewählt aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Avocado, Attalea, Berberis, Bixia, Brachychilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster, 15 Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeis, Erythroxylon, Euonymus, Erbse, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Kiwi, Lathyrus, Lonicera, Luffa, Lycium, Lycopersicum, Mais, Malpighia, Mangifera, Mormodica, Murraya, Musa, Nenga, Orange, Palisota, Pandanus, Passiflora, Persea, 20 Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sabal, Sambucus, Seaforita, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Synaspadix, Tabernae, Tamus, Taxus, Trichosanthes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vignia, Vitis oder Zucchini verwendet.

- 25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man als genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Knollen aufweist, eine Pflanze ausgewählt aus den Pflanzengattungen Rote Beete, Radieschen, Rettich und Solanum tuberosum.

- 30 Besonders bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp am Gesamtcarotinoidgehalt in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide einen höheren Anteil an α -Carotinoiden als β -Carotinoiden auf.

- 35 Besonders bevorzugte Pflanzen sind Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula wobei die Herstellung der β -Carotinoide, vorzugsweise Zeaxanthin, in Blüten, besonders bevorzugt in den Petalen stattfindet.

- Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter β -Cyclase-Aktivität in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive 40 Plastide, wie beispielsweise Blüten, Früchten oder Knollen beschrieben. Die Erhöhung

weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine β -Cyclase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und/oder der

5 endogenen β -Hydroxylase-Aktivität kann analog unter Verwendung von antisense-Nukleinsäuresequenzen oder Inverted-Repeat-Nukleinsäuresequenz anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine β -Cyclase erfolgen.

Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen

10 einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine β -Cyclase enthält, die mit einem oder mehreren

15 Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

20

Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäurekonstrukte enthaltend mindestens eine Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase und zusätzlich mindestens eine weitere

25 Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Nukleinsäuren kodierend eine β -Hydroxylase,
 - b) doppelsträngige endogenen β -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogene β -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen und
 - c) doppelsträngige ϵ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz und/oder ϵ -Cyclase
- 30 antisense-Ribonukleinsäuresequenz,

wobei die Nukleinsäuren mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Es ist, insbesondere in Pflanzen, technisch nur schwer zu realisieren, mehrere Aktivitäten mit einem Nukleinsäurekonstrukt zu erhöhen oder zu erniedrigen. Daher werden bevorzugt Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten verwendet um die Aktivitäten, insbesondere um mehr als 3 Aktivitäten in Pflanzen zu erhöhen oder zu erniedrigen.

35

Es ist jedoch auch möglich, genetisch veränderte Pflanzen zu kreuzen, die bereits veränderte Aktivitäten enthalten. Beispielsweise ist es durch Kreuzen von genetisch veränderten Pflanzen, die jeweils zwei veränderte Aktivitäten enthalten, möglich, Pflanzen mit vier veränderten Aktivitäten herzustellen. Gleiches kann auch erreicht werden, indem man eine Kombination von zwei Nukleinsäurekonstrukten die jeweils 2 Aktivitäten verändern in die Pflanzen einführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die bevorzugten genetisch veränderten Pflanzen durch Einbringen von Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten hergestellt.

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, wie beispielsweise Blüten, Früchten oder Knollen, gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Als erfindungsgemäßer Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzengeweben, ent-

haltend photosynthetisch inaktive Plastide, wie beispielsweise Blüte, Frucht oder Knolle steuern kann.

- 5 "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der
10 Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

15 Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promotor (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppel-
20 promotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin-1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991),
25 der Pnit-Promotor (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200, der Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase Promotor (Datenbankeintrag AB011474, Position 70127 bis 69493), der TPT-Promotor (WO 03006660), der „Superpromotor“ (US-Patent 5955646), der 34S-Promotor (US-
30 Patent 6051753) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol
35 Biol 48:89-108), durch den die Expression des β -Cyclase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor
40 (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor

(EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzengeweben sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von β -XCarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

5

Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635), der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593), der EPSPS-Promotor (M37029), der DFR-A Promotor (X79723), der B-Gen Promotor (WO 0008920) und der CHRC-Promotor (WO 98/24300; Vishnevetsky et al. (1996) Plant J. 10, 1111-1118),
10 der Promotor P76 und P84 (DE Patentanmeldung 10247599.7) sowie die Promotoren der Arabidopsis Gen-Loci At5g33370 (infolge M1 Promoter), At5g22430 (infolge M2 Promoter) und At1g26630 (infolge M3 Promoter).

15

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Methods in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

20

Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen die Expression der β -Cyclase in in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, wie beispielsweise Blüte, Frucht oder Knolle.

25

Bevorzugte Promotoren sind Promotoren die spezifisch für Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide sind.

30

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind, wie vorstehend erwähnt, je nach verwendeter Pflanze konstitutive, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische, fruchtspezifische und knollenspezifische Promotoren.

35

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen oder insbesondere einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz
35 SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

40

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen fruchtspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Amino-

säuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe dass der natürliche Promotor der β -Cyclase ausgenommen ist.

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen knollenspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe dass der natürliche Promotor der β -Cyclase ausgenommen ist.
- 10

- Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen konstitutiven Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe dass der natürliche Promotor der β -Cyclase ausgenommen ist.
- 15

- 20 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.
- 25
- 30

- Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.
- 35

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein β -Cyclase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der

β -Cyclase in die Chromoplasten vom β -Cyclase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

- Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.
- 10 Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

15

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC
GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCGTAAGGTCACCGGC-
20 GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAG-
GATCC_BamHI

pTP10

- 25 KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC
GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCGTAAGGTCACCGGC-
GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGCTG-
30 GATCC_BamHI

pTP11

- 35 KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC
GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCGTAAGGTCACCGGC-
GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGG-
GATCC_BamHI

40

Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu,

M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

5 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

10 Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

15 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

20 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

25 Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

30 Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in 35 Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19

(Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

5 Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

10 Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine β -Cyclase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN5 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen
15 verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

20 Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure
25 codierend eine β -Cyclase enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine β -Cyclase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale,
30 beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken
35 können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Pflanzen, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer β -Cyclase in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gegenüber dem Wildtyp erhöht und die erhöhte β -Cyclase-Aktivität durch eine β -Cyclase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp.

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung der Genexpression dadurch, dass man Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die β -Cyclasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Bevorzugt sind genetisch veränderte Pflanze, die mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, enthalten, mit der Maßgabe, dass Tomate ausgenommen ist.

Weiter besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

Weiter besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe ϵ -Cyclase-Aktivität und endogene β -Hydroxylase-Aktivität auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

Vorzugsweise sind die Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, ausgewählt sind aus der Gruppe Blüte, Frucht und Knolle.

- In einer bevorzugten Ausführungsform sind die genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Blüten aufweisen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

- Besonders bevorzugt sind Pflanzen, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Calendula officinalis, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Cucurbita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Marattia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Solanum tuberosum, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Früchten aufweisen ausgewählt aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Avocado, Attalea, Berberis, Bixia, Brachychilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster, Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeis, Erythroxylon, Euonymus, Erbse, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Kiwi, Lathyrus, Lonicera, Luffa, Lycium, Lycopersicum, Mais, Malpighia, Mangifera, Mormodica, Murraya, Musa, Nenga, Orange, Palisota, Pandanus, Passiflora, Persea, Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sabal, Sambucus, Seaforita, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Synaspadix, Tabernae, Tamus, Taxus, Trichosanthes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vignia, Vitis oder Zucchini verwendet.

55

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Knollen aufweisen *Solanum tuberosum*.

- 5 Besonders bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp am Gesamtcarotinoidgehalt in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide einen höheren Anteil an α -Carotinoiden als β -Carotinoiden auf.

- 10 Besonderes bevorzugt sind genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 15 Besonders bevorzugte Pflanzen sind Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula* wobei die Herstellung der β -Carotinoide, vorzugsweise Zeaxanthin, in Blüten, besonders bevorzugt in den Petalen stattfindet.

- 20 Besonders bevorzugte Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide sind die Wurzelknolle von *Solanum tuberosum*, die Samenfrüchte von *Zea Mais*, die Blüte von *Tagetes erecta* und die Blüte von *Calendula officinalis*.

- 25 Die genetisch veränderten Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Blütenblätter, Knollen oder Früchte sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

- Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von β -Carotinoiden, insbesondere β -Carotin und Zeaxanthin verwendet werden.

- 30 Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an β -Carotinoiden können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Ferner können die
- 35 genetisch veränderten Pflanzen zur Herstellung von β -Carotinoid-haltigen Extrakten der Pflanzen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

- 40 Zeaxanthinhaltige Extrakten können zur Pigmentierung von Tierprodukten insbesondere der Familie Galiformes, verwendet werden. Die Pigmentierung erfolgt

durch orale Verabreichung der zeaxanthinhaltigen Extrakte, die dem jeweiligen Tier entsprechend prozessiert und zu oralen Verabreichung aufbereitet wurden. Unter Tierprodukten werden insbesondere Haut, Fleisch, Feder und Eidotter verstanden

- 5 Die genetisch veränderten Pflanzen können auch als Zierpflanzen im Horticulture-Bereich verwendet werden.

- Die genetisch veränderten Pflanzen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an β -Carotinoiden in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, auf.
- 10

Unter einem erhöhten Gehalt an β -Carotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt- β -Carotinoid verstanden.

- 15 Unter einem erhöhten Gehalt an β -Carotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten β -Carotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, einen erhöhten Gehalt an β -Carotin oder Zeaxanthin, insbesondere Zeaxanthin auf.
- 20

- Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an β -Carotinoiden, bzw. β -Carotin oder Zeaxanthin verstanden.
- 25

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

- 30 Allgemeine Experimentelle Bedingungen:
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).
- 35

57

Beispiel 1: Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der chromoplastenspezifischen Lycopin β cyclase aus *Lycopersicon esculentum* unter Kontrolle des Promoters P76

- 5 a) Isolation von Promoter P76 mittels PCR mit genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* als Matrize.

Hierzu wurden die Oligonukleotid Primer SEQ. ID. No. 20 (P76for) und SEQ. ID. NO. 21 (P76rev) verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei der Synthese mit einem
10 5' Phosphatrest versehen. Die genomische DNA wurde aus *Arabidopsis thaliana* wie beschrieben (Galbiati M et al. Funct. Integr. Genomics 2000, 20 1:25-34) isoliert.

Die PCR Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt:

- 15 80ng genomische DNA
1x:Expand Long Template PCR Puffer
2,5 mM MgCl₂
je 350 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP
je 300 nM eines jeden Primers
20 2,5 Units Expand Long Template Polymerase
in einem Endvolumen von 25 μ l

Folgendes Temperaturprogramm wird verwendet:

- 25 1 Zyklus mit 120 sec bei 94°C
35 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 48°C für 30 sec und 68°C für 3 min
1Zyklus mit 68°C für 10 min

- Das PCR Produkt (SEQ. ID. NO. 22) wird mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und
30 das 1032 bp Fragment durch Gelelelution isoliert.

Der Vektor pSun5 wird mit der Restriktionsendonuklease EcoRV verdaut und ebenfalls über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und durch Gelelelution gewonnen.

- 35 Das gereinigte PCR Produkt wird in den so behandelten Vektor kloniert.

Um die Orientierung des Promotors im Vektor zu überprüfen wird mit der Restriktionsendonuklease BamHI verdaut. Entsteht hierbei ein 628 bp Fragment ist die Orientierung entsprechend der Abb. 2.

Dieses Konstrukt wird mit p76 bezeichnet.

- b) Isolation der Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase (Bgene) mittels PCR mit genomischer DNA von *Lycopersicon esculentum* als Matrize.

5

Hierzu wurden die Oligonukleotid Primer SEQ. ID. NO. 23 (BgeneFor) und SEQ. ID. NO. 24 (BgeneRev) verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei der Synthese mit einem 5' Phosphatrest versehen. Die genomische DNA wurde aus *Lycopersicon esculentum* wie beschrieben (Galbiati M et al. Funct. Integr. Genomics 2000, 20 1:25-34) isoliert.

10

Die PCR Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt:

80ng genomische DNA

15

1x Expand Long Template PCR Puffer

2,5 mM MgCl₂

je 350 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP

je 300 nM eines jeden Primers

2,5 Units Expand Long Template Polymerase

20

in einem Endvolumen von 25 μ l

Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

1 Zyklus mit 120 sec bei 94°C

25

35 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 48°C für 30 sec und 68°C für 3 min

1 Zyklus mit 68°C für 10 min

Das PCR Produkt wurde mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und das 1486 bp Fragment durch Gelelution isoliert.

30

Der Vektor p76 wird mit der Restriktionsendonuklease SmaI verdaut und ebenfalls über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und durch Gelelution gewonnen.

Das gereinigte PCR Produkt wird in den so behandelten Vektor kloniert.

35

Um die Orientierung von Bgene im Vektor zu überprüfen wird mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut. Entsteht hierbei ein 445 bp Fragment ist die Orientierung entsprechend der Abb. 2.

Dieses Konstrukt wird mit p76Bgene bezeichnet.

40

Beispiel 2: Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz-Expressionskassetten für die blütenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

5

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721)

10

Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

15

Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID No. 25) und PR10 (SEQ ID

20

No. 28) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) kodiert, erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 1 ml genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 25)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 28)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28,8 ml Aq. Dest.

30

35

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

40

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-
5 Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten.
Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch
eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaus-
tausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten
10 AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet (Position 33: T
statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unab-
hängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleo-
tidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung
15 des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200-9771 wurde mit den Primern PR7
(SEQ ID No. 25) und Primern PR9 (SEQ ID No. 27) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die
Region 9526-9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID No. 26) und PR10 (SEQ ID No. 28)
amplifiziert (Amplifikat A8/10).

20 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen
Region 10200-9771 und 9526-9285 des AP3 Promoters kodieren, erfolgte in 50 µl
Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 25
- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
 - 0,25 mM dNTPs
 - 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 15) bzw. PR8. (SEQ ID-No. 26)
 - 0,2 mM PR9 (SEQ ID No. 17) bzw. PR10 (SEQ ID No. 28)

30

 - 5 µl 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
 - 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
 - 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

35

1 X 94°C 2 Minuten

35 X 94°C 1 Minute

50°C 2 Minuten

72°C 3 Minuten

1 X 72°C 10 Minuten

- Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670-9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10

- 0,5 mg A7/9
- 0,25 mg A8/10

15

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17,6 ml A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 20 - 2 ml 1 X Klenow Puffer
- 2 U Klenow Enzym

25

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID No. 25) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID No. 28) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 30 - 1 ml Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 35 - 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 25)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 28)
- 5 ml 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1 X 94°C 2 Minuten
- 5 35 X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minuten
- 72°C 1 Minuten
- 1 X 72°C 10 Minuten

- 10 Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID No. 25 und PR10 SEQ ID No. 28 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285-9526 deletiert wurde.
- 15 Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

- 20 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJAP3P.

- 25 Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der Primer PR40 (Seq ID No. 30) und Primer PR41 (Seq ID No. 31) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 30 Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
 - 1 ml p35SGUS INT
 - 0,25 mM dNTPs
 - 35 - 0,2 mM PR40 (SEQ ID No. 30)
 - 0,2 mM PR41 (SEQ ID No. 31)
 - 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
 - 0,25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
 - 28,8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten
- 5 35X 94°C 1 Minute
- 53°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

- 10 Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klons mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.
- 15 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

- Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp Sall-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem Sall-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der
- 20 Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3'Ende des *rbcs* Transitpeptides enthält, heißt pJA11 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

- 25 In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcs* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

- 30 Beispiel 3: Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

- Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA
- 35 (Genbank accession no. AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID NO. 32) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID NO. 33) amplifiziert. Die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 bp 5'Nicht-translatierter Sequenz
- 40 (5'UTR) und 297 bp der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von Tagetes wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2,5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO. 29) in cDNA umgeschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR42 (SEQ ID No. 32)
- 0,2 mM PR43 (SEQ ID No. 33)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR44 (SEQ ID No. 34)
- 0,2 mM PR45 (SEQ ID No. 35)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)

- 1X 94°C 2 Minuten
35X 94°C 1 Minute
58°C 1 Minute
72°C 1 Minute
5 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

10

Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz

15

AF251016 (SEQ ID No. 7) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klon wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 2) verwendet.

20

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heißt pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

25

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heißt pJAI3. Durch die

30

Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

- Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID No. 50) und PRCHRC3 (SEQ ID No. 51) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

40

in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klon pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

5

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält, heißt pJCI3.

10

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

15

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktkarte).

20

In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *5sense* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *5anti* die 5'Region der Epsilon-cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

25

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5, Konstruktkarte).

30

In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment *CHRC* den Promoter (1537 bp), Fragment *5sense* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *5anti* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

35

Beispiel 4: Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'-Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

- 5 Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession no. AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID NO. 36) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID NO. 37) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus
10 *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel 3 beschrieben.

- 15 Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel 2 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID No. 19) beschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

- 20 Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR46 (SEQ ID No. 36)
- 0,2 mM PR47 (SEQ ID No. 37)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
30 - 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

- Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz,
35 in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR48 (SEQ ID No. 38)

- 0,2 mM PR49 (SEQ ID No. 39)
- 5 ml 10 X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 ml Aq. Dest.

5

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 10 58°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

15 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO.36 und SEQ ID NO. 37 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO.38 und SEQ ID NO. 39 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

20 Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO. 7) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 2) verwendet.

25

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heißt pJAI4. Durch die

30 Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit

35 dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heißt pJAI5. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragmente 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI5 wurde das 2523 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI5 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5, Konstruktkarte).

In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *sense* die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *anti* die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in anti-sense Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 5: Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463) unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tagetes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 µg genomische DNA in einem 25 µl Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 µl verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO. 40) und PR51 (SEQ ID NO. 41) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 7).

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR50 (SEQ ID No. 40)
- 0,2 mM PR51 (SEQ ID No. 41)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)

- 0,25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 5
- 1X 94°C 2 Minuten
 - 35X 94°C 1 Minute
 - 53°C 1 Minute
 - 72°C 1 Minute
- 10 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 7).

- 15
- Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID No. 9. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.
- 20

Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

- 25 Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,2 mM jedes dNTPs
- 0,2 mM PR60 (SEQ ID No. 42)
- 30 - 0,2 mM AD1 (SEQ ID No. 45)
- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 20 µl aufgefüllt

- 35 AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

71

Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt

- 1X 93°C: 1 Min., 95°C: 1 Min.
5X 94°C: 30 Sek., 62°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.
5 1X 94°C: 30 Sek., 25°C: 3 Min., ramp to 72°C in 3 Min.
72°C: 2,5 Min
15X 94°C: 10 Sek., 68°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.;
94°C: 10 Sek., 68°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.;
94°C: 10 Sek., 29°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.
10 1X 72°C: 5 Min.

Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 15 - 1 ml einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes
(hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,8 mM dNTP
- 0,2 mM PR61 (SEQ ID No. 43)
- 0,2 mM AD1 (SEQ ID No. 45)
- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
20 - 0,5 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 21 ul aufgefüllt

Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 25 12X 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
94°C: 10 Sekunden, 29°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten
1X 72°C: 5 Minuten

- 30 Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes
(hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,8 mM dNTP
35 - 0,2 mM PR63 (SEQ ID No. 44)
- 0,2 mM AD1 (SEQ ID No. 45)
- 10 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 ml R Taq Polymerase (TAKARA)

- mit Aq. Dest. auf 100 µl aufgefüllt

Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 5 20X 94°C: 15 Sekunden, 29°C: 30 Sekunden, 72°C: 2 Minuten
1X 72°C: 5 Minuten

- 10 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 8).

- 15 Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID No. 9. Diese Sequenz ist identisch mit der ecyclase Region innerhalb der Sequenz SEQ ID No. 7, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde, und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

- 20 Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID No. 9) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heißt pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

- 25 Beispiel 6: Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterregion der Epsilon-Cyclase cDNA).

- 30 Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel 2) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession no. AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel 2) miteinander verbunden sind.

- 35 Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel 5) und der Primer PR124 (SEQ ID No. 46) und PR126 (SEQ ID No. 48) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID No. 47) und PR127 (SEQ ID No. 49) hergestellt.

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR124 (SEQ ID No. 46)
- 10 - 0,2 mM PR126 (SEQ ID No. 48)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

15 Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 20 - 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR125 (SEQ ID No. 47)
- 0,2 mM PR127 (SEQ ID No. 49)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25 - 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten
- 30 35X 94°C 1 Minute
- 53°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

35 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID No. 7. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 2) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heißt cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heißt cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO. 51) und PRCHRC5' (SEQ ID NO. 50) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält, heißt cs45.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJAI1 wurde unter

75

Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

5

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp *SacI*-*XhoI* Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den *XhoI* geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält, heißt cs46.

10

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

15

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI7 wurde das 1685bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus cs44 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 9, Konstruktkarte).

20

In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

25

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 2445bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus cs45 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstruktkarte).

30

In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

35

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 3219bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus cs46 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 11, Konstruktkarte).

40

In der Abbildung 11 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense

Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment *AP3P* das 771 bp AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

5 Beispiel 7: Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20 bis 200
10 μ E/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 μ E, für 4 bis 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei
15 Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

Der Agrobakterium *tumefaciens* Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid PS5A13 transformiert. Die Anzucht des transformierten *A. tumefaciens* Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB
20 (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H₂O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, dass eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kulti-
25 vierung mit dem Blattmaterial verwendet.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln
30 bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt,
35 dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 μ Mol/m² x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält.
40 Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr

geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

5

Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l

10 Gibberillinsäure GA_3 , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

15

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

20

- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.

25

- Die Zugabe von $AgNO_3$ (3 bis 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.

30

- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.

- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

35 Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit p76Bgene (aus Beispiel 1) wurde erhalten: MK14-1-1

Mit pS5A13 wurde erhalten: CS30-1, CS30-3 und CS30-4

40

Beispiel 8: Charakterisierung der transgenen Pflanzen

Beispiel 8.1: CS30-1, CS30-3 und CS30-4

- 5 Das Blütenmaterial der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen CS30-1, CS30-3 und CS30-4 aus Beispiel 7 wurde in flüssigem Stickstoff gemörstert und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 μ l). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 μ l Aceton resuspendiert.
- 10 Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnte zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), *Plant Journal* 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.
- 15 Tabelle 1 zeigt das Carotinoidprofil in *Tagetes* petalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen *Tagetes*- und Kontroll*Tagetes*pflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [μ g/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben. Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch
- 20 veränderten Pflanzen einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des "β-Carotin-Weges", wie beispielsweise β-Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des "α-Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 1

25

Pflanze	Lutein	b-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)
Kontrolle	280	4,1	2,6	42	329
CS 32-9	69 (-75%)	5,5 (+34%)	2,3 (-12%)	25 (-38%)	102 (-69%)

Beispiel 8.2: Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in *Tagetes erecta* durch Antisense
CS 32-9

5 Unter Verwendung herkömmlicher, dem Fachmann bekannter Methoden wurde als Vergleichsbeispiel eine *Tagetes erecta* Antisense-Linie CS32-9 hergestellt bei der die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität durch Antisense erfolgte. Das Carotinoidprofil dieser Linie (CS32-9), gemessen nach vorstehend beschriebener Methode ist ebenfalls in Tabelle 1 dargestellt.

10 Beispiel 8.3: Alkalische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide von MK14-1-1

15 Die Blütenblätter der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen MK14-1-1 aus Beispiel 7 wurden in flüssigem Stickstoff gemörst und das Petalenpulver (etwa 20 mg) mit 100% Aceton extrahiert (dreimal je 500 μ l). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Rückstand in 180 μ l Aceton aufgenommen. Um Homogenität des Extraktes zu gewährleisten wurde der Extrakt für zwei Minuten mit Ultraschall behandelt

20 Dem Extrakt wurden 20 μ l 10%ige KOH in Methanol zugesetzt und 30 min bei Raumtemperatur bei 1000-1300 rpm geschüttelt. Hiernach wurde der Extrakt mit HCL auf pH 7,5 titriert und bei 10000 g für 10 min zentrifugiert.

25 Der Überstand wurde mittels einer C30-reverse phase-Säule analysiert. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren und aufgrund der Massen möglich.

30 Die Überexpression der erfindungsgemäßen β Cyclase (Bgene) aus *Lycopersicon esculentum* unter der Kontrolle des blütenspezifischen Promoters P76 aus *Arabidopsis thaliana* in *Tagetes erecta* führte überraschend nicht nur zur Akkumulation von höheren Mengen β Carotinoiden sondern zu einer drastischen Verringerung der Menge von α -Carotinoiden zugunsten der Menge von β Carotinoiden.

35 Hierdurch wurden die in der Blüte von *Tagetes erecta* vorhandenen α -Carotinoid Mengen von im Wildtyp über 80 % auf unter 30 % der Gesamtcarotinoide reduziert und der Anteil der β Carotinoide am Gesamtcarotinoidgehalt von im Wildtyp unter 20 % auf über 70% erhöht (Siehe Abbildung 1).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, aufweisen und die erhöhte β -Cyclase-Aktivität durch eine β -Cyclase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe, dass Tomate als Pflanze ausgenommen ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanzen einbringt, die β -Cyclasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression der β -Cyclase unter Kontrolle eines Promotors stattfindet, der die Expression der β -Cyclase in den Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gewährleistet.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Expressionsrate der β -Cyclase aufweisen.
- 5
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression der β -Cyclase unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors erfolgt.
- 10
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen.
- 15
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, die Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression eine Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase in die Pflanze einbringt.
- 25
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt, die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 9 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 9 aufweist.
- 30
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 8 einbringt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Expressionsrate der Hydro-

xylase aufweisen.

- 5 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression der Hydroxylase unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors erfolgt.
- 10 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe ϵ -Cyclase-Aktivität und endogene β -Hydroxylase Aktivität aufweisen.
- 15 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und/oder der endogenen β -Hydroxylase Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren erreicht:
- 20 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 25 b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 30 c) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz jeweils kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 35 d) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-sense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-sense-Ribonukleinsäuresequenz zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- e) Einbringen mindestens eines DNA-oder Protein-bindenden Faktors gegen ein ϵ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein und/oder endogenes β -Hydroxylase-Gen,

-RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,

- 5 f) Einbringen mindestens einer den ϵ -Cyclase-RNA und/oder endogenen β -Hydroxylase-RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 10 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem ϵ -Cyclase-Gen und/oder endogenem β -Hydroxylase-Gen in Pflanzen.
17. Verfahren nach Anspruch 16, Ausführungsform a), dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-
- 15 Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze-eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- 20 b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase -Promotor-Sequenz identisch ist.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz enthält, die mit mindestens einem
- 25 Teil des Pflanze-eigenen ϵ -Cyclase -Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze-eigenen Nukleinsäure, kodierend eine ϵ -Cyclase enthält.
19. Verfahren nach Anspruch 16, Ausführungsform a), dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-
- 30 Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze-eigenen, endogenem β -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder
- 35 b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase -Promotor-Sequenz identisch ist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz enthält, die mit mindestens einem Teil des Pflanze-eigenen, endogenen β -Hydroxylase -Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze-eigenen Nukleinsäure, kodierend eine endogene β -Hydroxylase enthält.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die geringste Expressionsrate einer ϵ -Cyclase und/oder endogenen β -Hydroxylase aufweisen.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription der doppelsträngigen Ribonukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 16, Ausführungsform a) und/oder der Antisense-Sequenzen gemäß Anspruch 16, Ausführungsform b) unter Kontrolle eines Promotors erfolgt, der für die Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, spezifisch ist.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Pflanzen erntet und anschließend die β -Carotinoide aus den Pflanzen oder den Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, isoliert.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, ausgewählt sind aus der Gruppe Blüte, Frucht und Knolle.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass man als genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Blüten aufweist, eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae verwendet.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Calendula officinalis*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leon-
todon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lysimachia*, *Marattia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyra-
cantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Solanum tuberosum*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia* verwendet.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass man als genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Früchten aufweist, eine Pflanze ausgewählt aus den Pflanzengattungen *Actinophloeus*, *Aglaeonema*, *Ananas*, *Arbutus*, *Archontophoenix*, *Area*, *Aronia*, *Asparagus*, *Avocado*, *Attalea*, *Berberis*, *Bixia*, *Brachychilum*, *Bryonia*, *Caliptocalix*, *Capsicum*, *Carica*, *Celastrus*, *Citrullus*, *Citrus*, *Convallaria*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cuscuta*, *Cycas*, *Cyphomandra*, *Dioscorea*, *Diospyrus*, *Dura*, *Elaeagnus*, *Elaeis*, *Erythroxylon*, *Euonymus*, *Erbse*, *Ficus*, *Fortu-
nella*, *Fragaria*, *Gardinia*, *Gonocaryum*, *Gossypium*, *Guava*, *Guilielma*, *Hibiscus*, *Hippophaea*, *Iris*, *Kiwi*, *Lathyrus*, *Lonicera*, *Luffa*, *Lycium*, *Mais*, *Malpighia*, *Mangi-
fera*, *Mormodica*, *Murraya*, *Musa*, *Nenga*, *Orange*, *Palisota*, *Pandanus*, *Passiflora*, *Persea*, *Physalis*, *Prunus*, *Ptychandra*, *Punica*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Ribes*, *Rosa*, *Rubus*, *Sabal*, *Sambucus*, *Seaforita*, *Shepherdia*, *Solanum*, *Sorbus*, *Synaspadix*, *Tabernae*, *Tamus*, *Taxus*, *Trichosanthes*, *Triphasia*, *Vaccinium*, *Viburnum*, *Vignia*, *Vitis* oder *Zucchini* verwendet.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass man als genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Knollen aufweist, *Solanum tuberosum* verwendet.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die β -Carotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe β -Carotin, β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin.
- 5 30. Genetisch veränderte Pflanze, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer β -Cyclase in Pflanzenteilen, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gegenüber dem Wildtyp erhöht und die erhöhte β -Cyclase-Aktivität durch eine β -Cyclase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 10 31. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
- 15 32. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die β -Cyclasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 20 33. Genetisch veränderte Pflanze, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe, dass Tomate ausgenommen ist.
- 25 30

34. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich die Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 5 35. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe ϵ -Cyclase-Aktivität und endogene β -Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp reduziert.
- 10 36. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, ausgewählt sind aus der Gruppe Blüte, Frucht und Knolle.
- 15 37. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Blüten aufweist, ausgewählt ist aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, 20 Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.
- 25 38. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Calendula officinalis, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcurbita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, 30 Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leonodon, Lilium, Linum, Lotus, Lysimachia, Marattia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, 35 Sinapsis, Solanum tuberosum, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon,

Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

39. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp
5 eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Früchten aufweist, ausgewählt ist aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Avocado, Attalea, Berberis, Bixia, Brachychilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster, Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeis, Erythroxylon, Euonymus, Erbse, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Kiwi, Lathyrus, Lonicera, Luffa, Lycium, Mais, Malpighia, Mangifera, Mormodica, Murraya, Musa, Nenga, Orange, Palisota, Pandanus, Passiflora, Persea, Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sabal, Sambucus, Seaforita, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Synaspadix, Tabernae, Tamus, Taxus, Trichosanthes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vignia, Vitis oder Zucchini.
40. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp
20 eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Knollen aufweist Solanum tuberosum ist.
41. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen oder Pflanzengewebe nach einem der Ansprüche 30 bis 40 als Futter- oder Nahrungsmittel.
25
42. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen oder Pflanzengewebe nach einem der Ansprüche 30 bis 40 zur Herstellung von β -carotinoidhaltigen Extrakten oder zur Herstellung von β -carotinoidhaltigen Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln.
30
43. Verwendung von zeaxanthinhaltigen Extrakten gemäß Anspruch 42 zur Pigmentierung von Tierprodukten.

Abb. 1

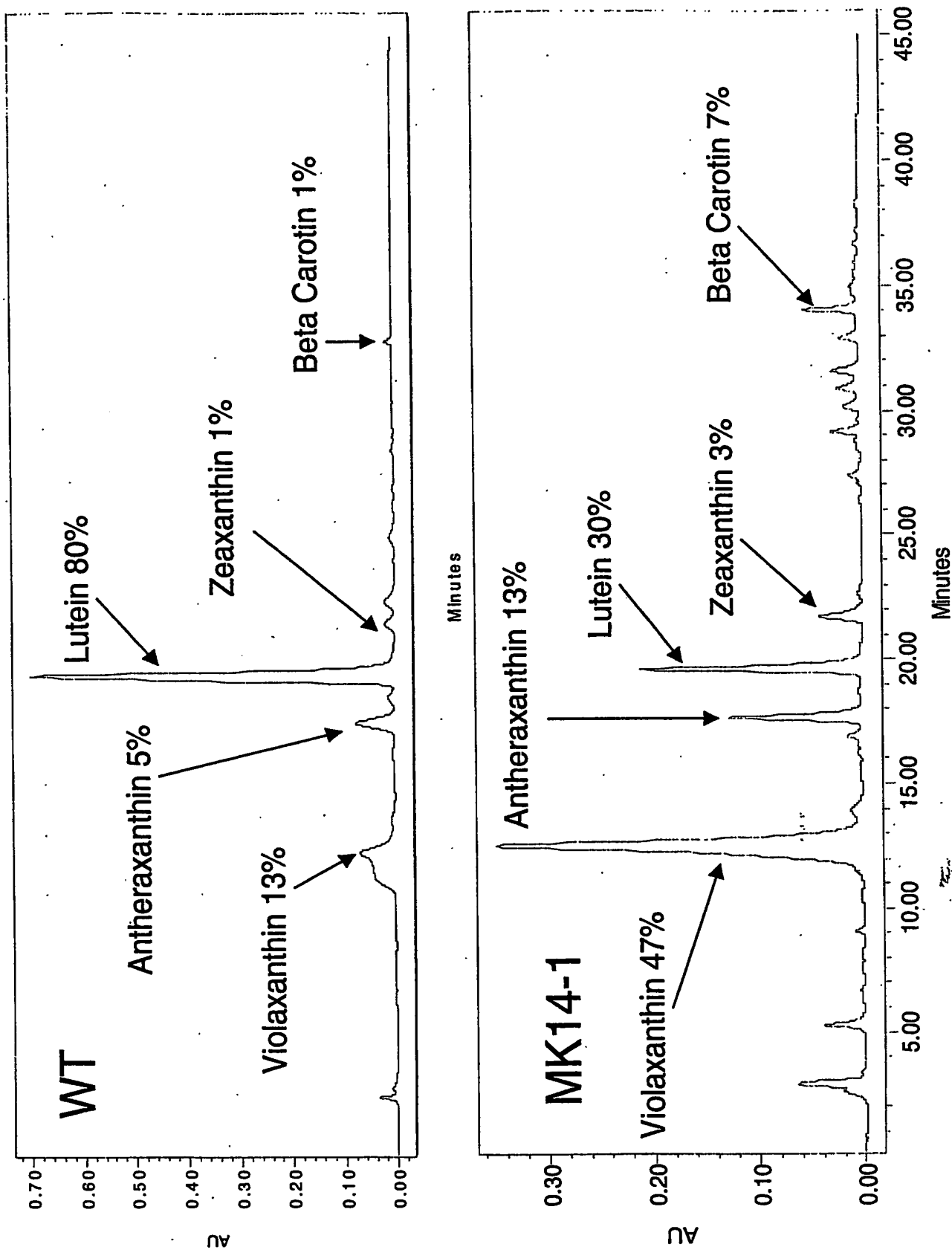


Abb. 2

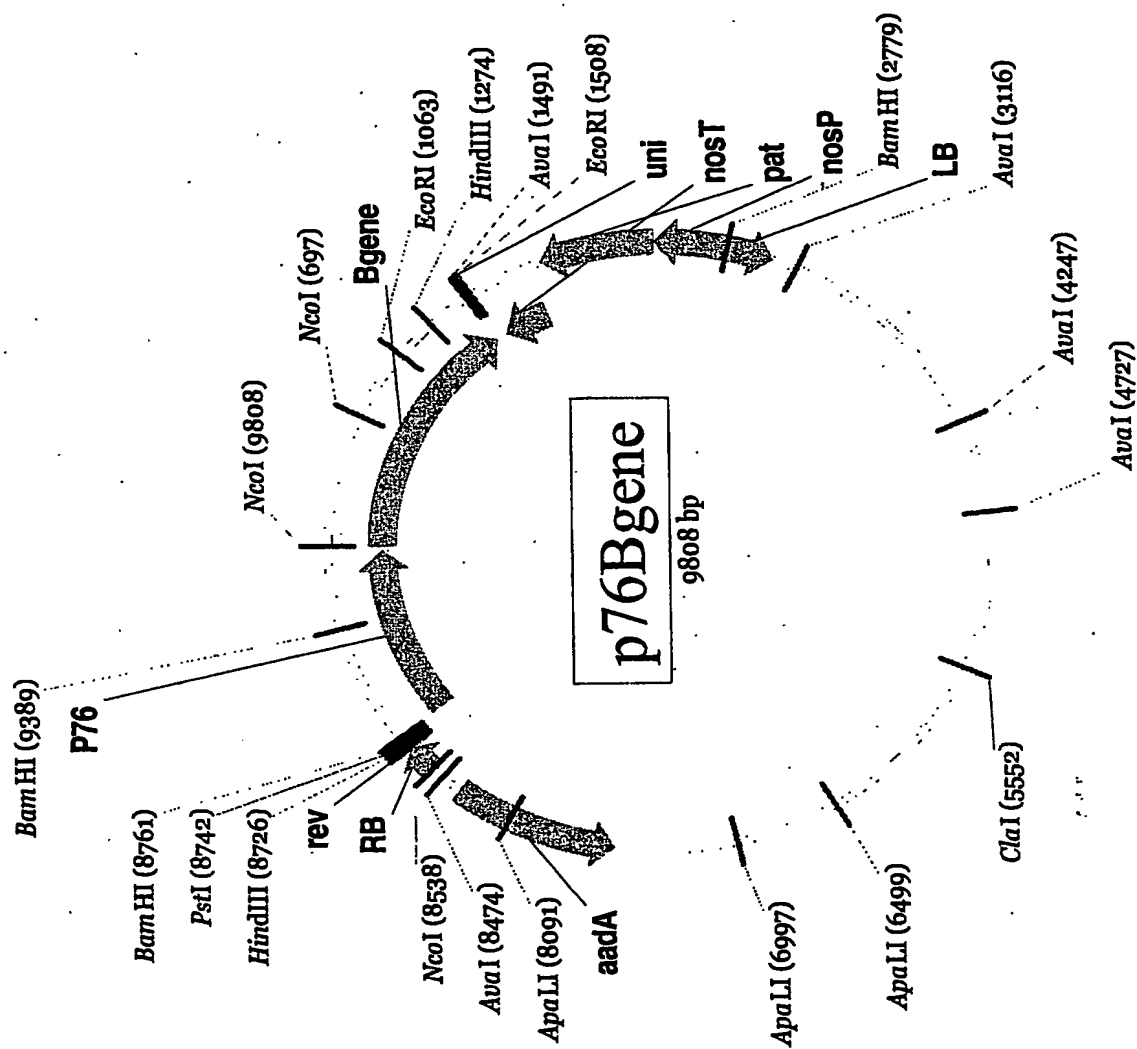
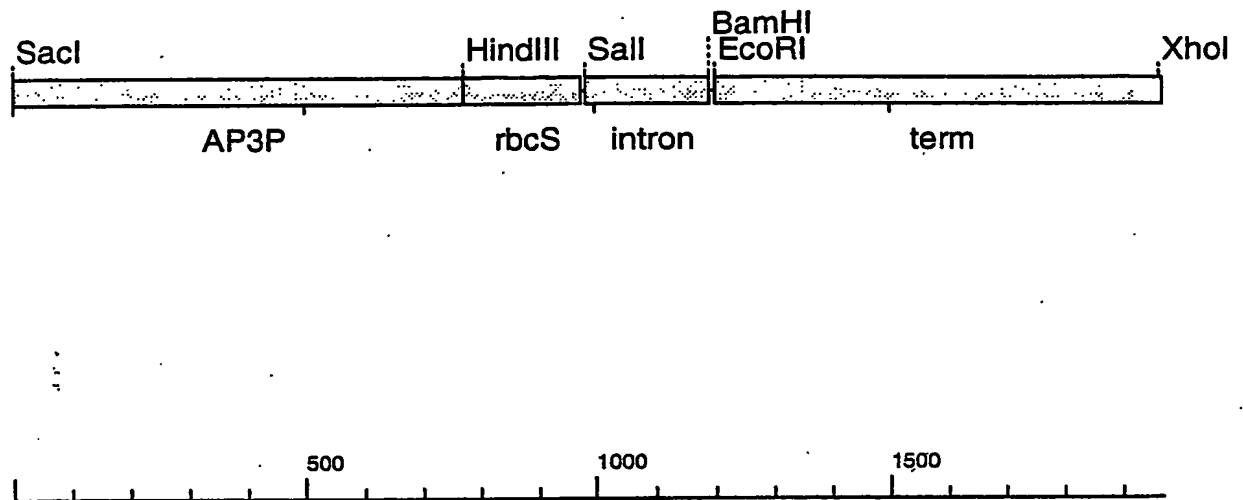


Abbildung 3: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*



pJA11 (1966 bps)

Abbildung 4: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

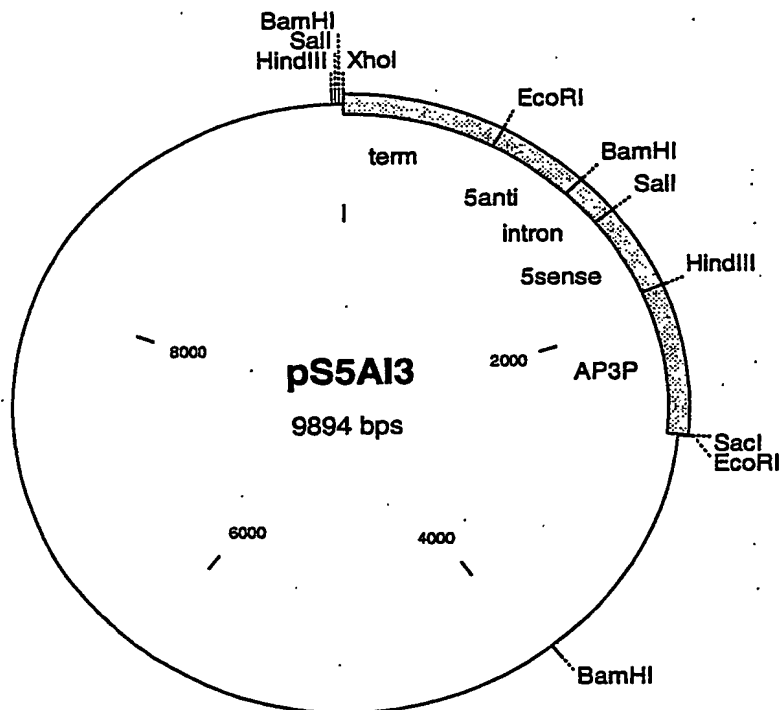


Abbildung 5: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters

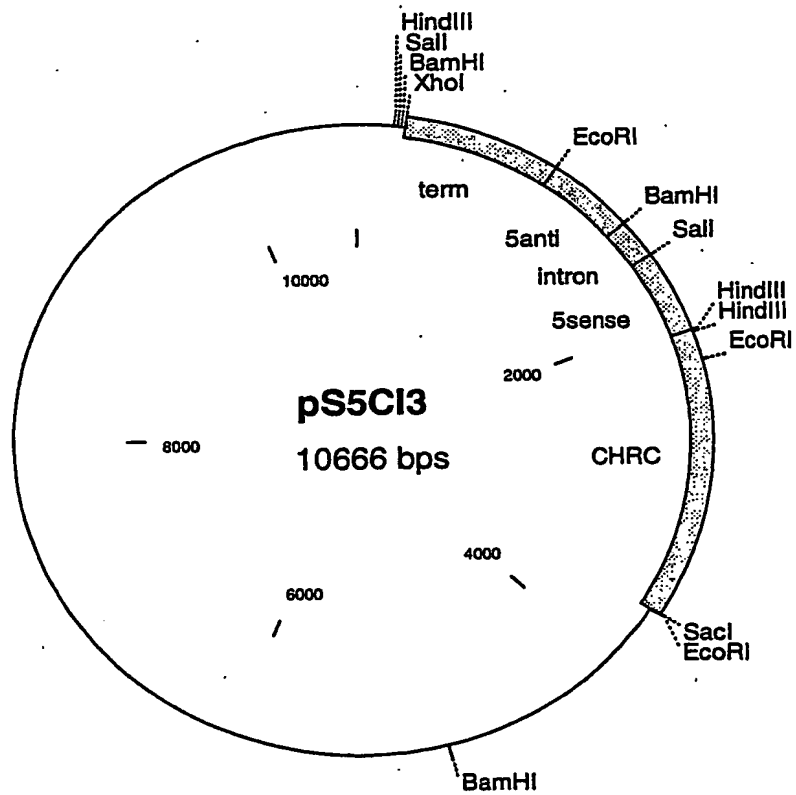


Abbildung 6: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

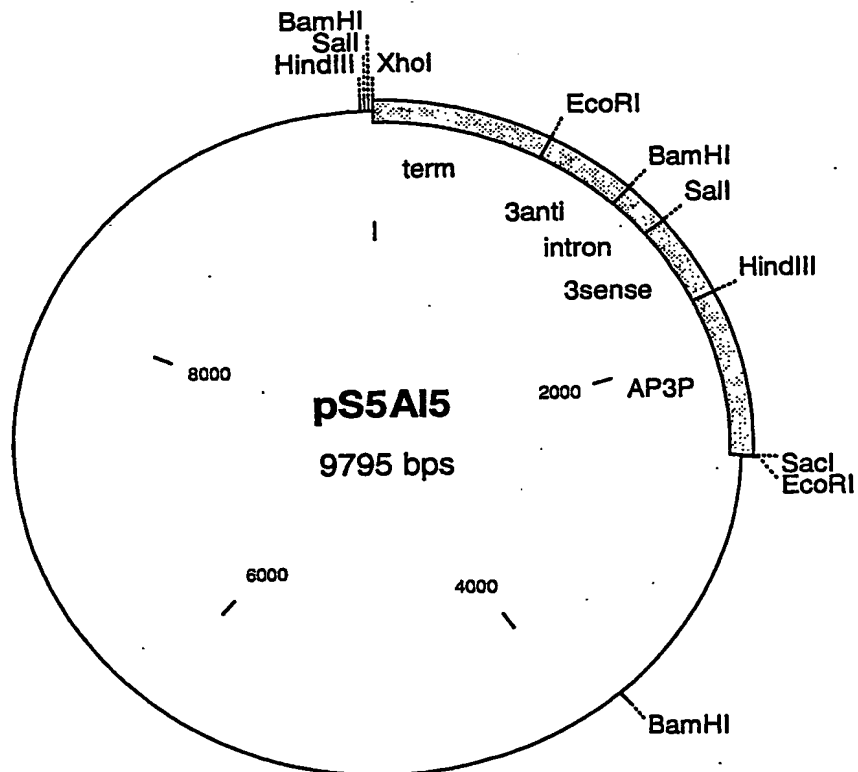


Abbildung 6: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

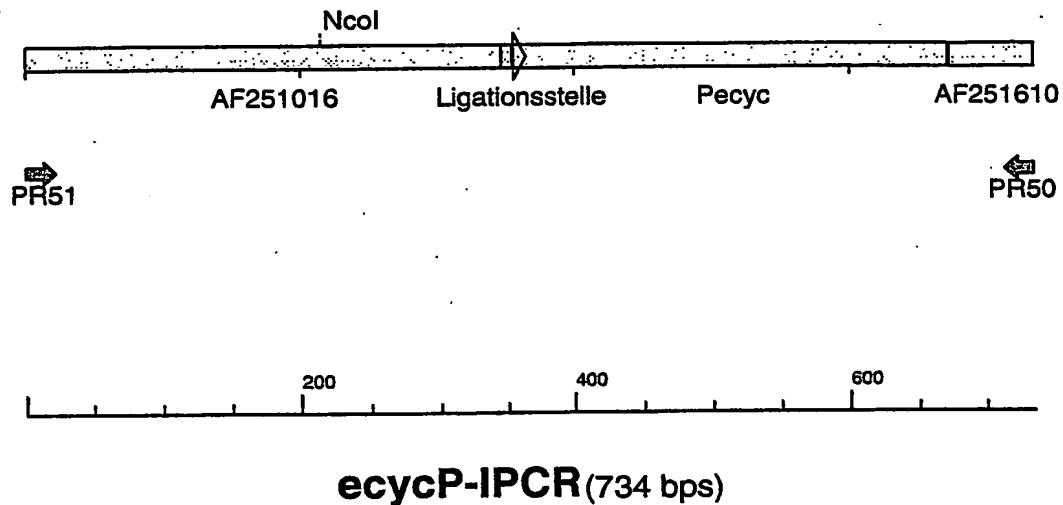


Abbildung 8: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

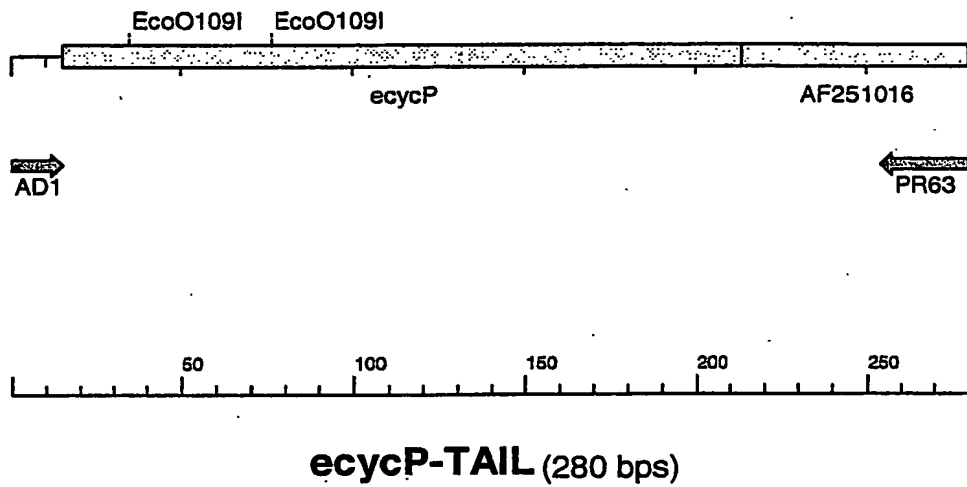


Abbildung 9: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

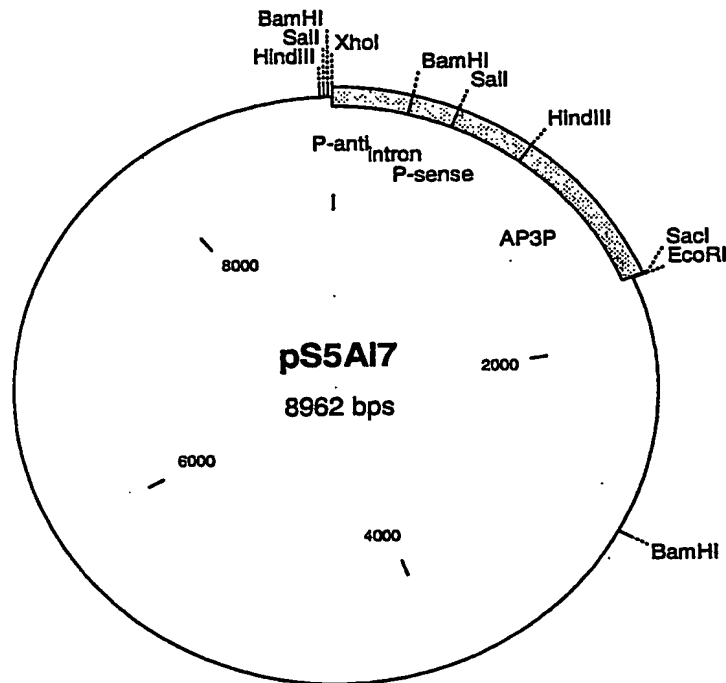


Abbildung 10: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

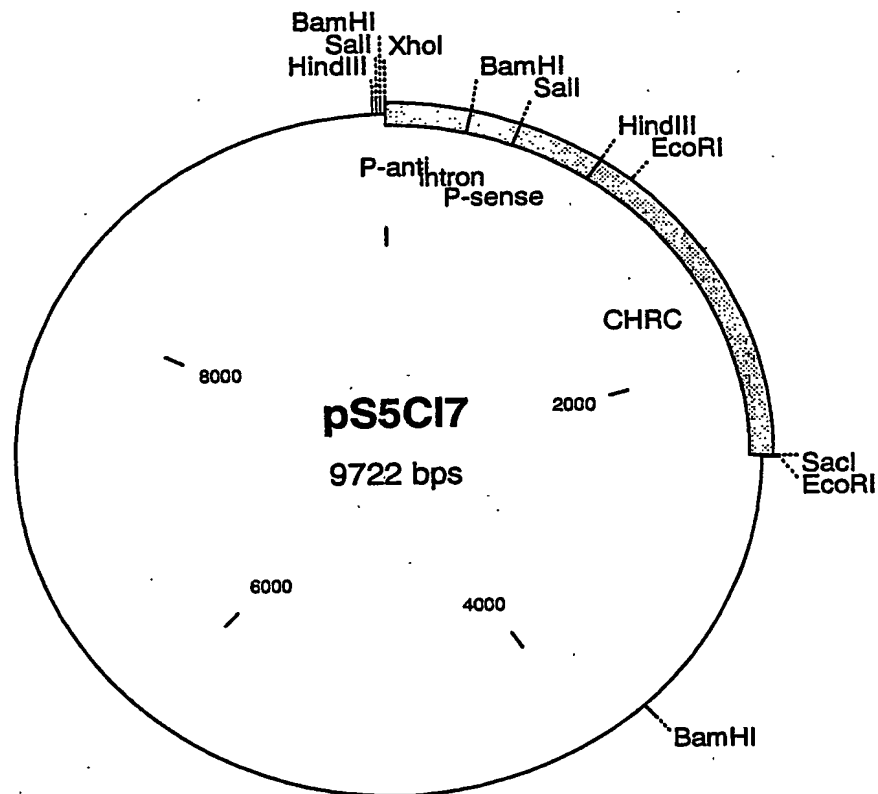
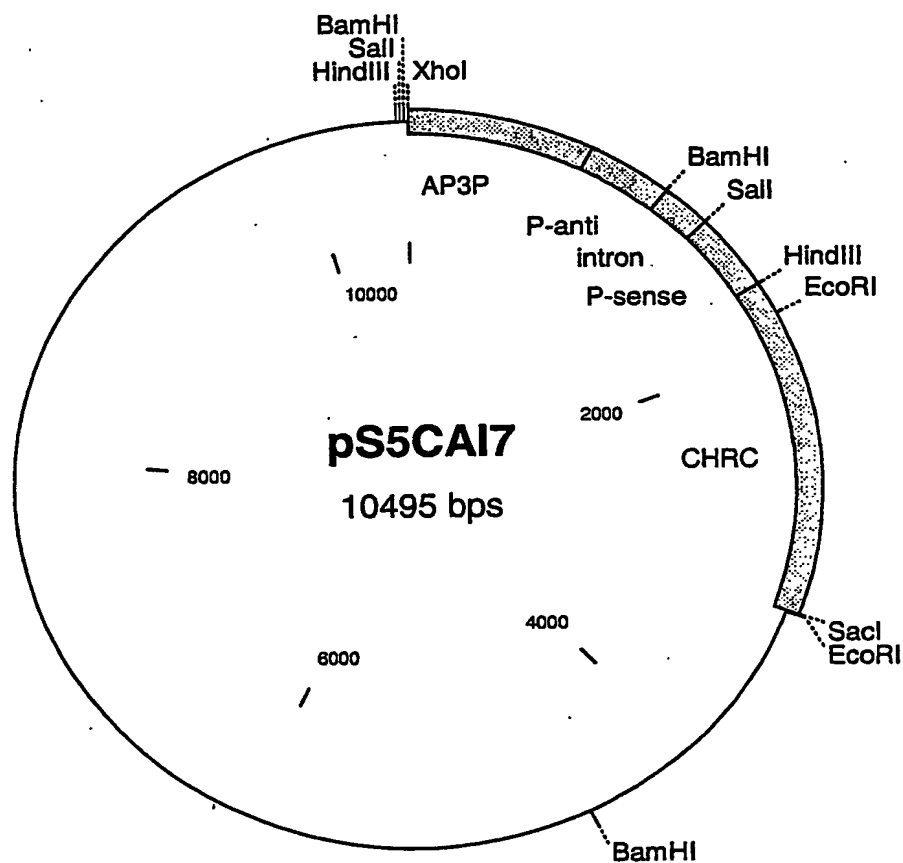


Abbildung 11: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp 5' Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters



SEQUENCE LISTING

5 <110> SunGene GmbH & Co. KGaA

10 <120> Verfahren zur Herstellung von b-Carotinoiden

<130> PF 54755

15 <160> 51

20 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 1666

<212> DNA

30 <213> Lycopersicon esculentum

35 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1494)

40 <223>

45 <400> 1

atg gaa gct ctt ctc aag cct ttt cca tct ctt tta ctt tcc tct cct	48
Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ser Pro	
1 5 10 15	

50 aca ccc cat agg tct att ttc caa caa aat ccc tct ttt cta agt ccc 96

Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro	
20 25 30	

acc acc aaa aaa aaa tca aga aaa tgt ctt ctt aga aac aaa agt agt 144

2

	Thr	Thr	Lys	Lys	Lys	Ser	Arg	Lys	Cys	Leu	Leu	Arg	Asn	Lys	Ser	Ser	
			35					40					45				
5	aaa	ctt	ttt	tgt	agc	ttt	ctt	gat	tta	gca	ccc	aca	tca	aag	cca	gag	192
	Lys	Leu	Phe	Cys	Ser	Phe	Leu	Asp	Leu	Ala	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Glu	
		50					55					60					
10	tct	tta	gat	gtt	aac	atc	tca	tgg	gtt	gat	cct	aat	tcg	aat	cgg	gct	240
	Ser	Leu	Asp	Val	Asn	Ile	Ser	Trp	Val	Asp	Pro	Asn	Ser	Asn	Arg	Ala	
	65					70				75					80		
15	caa	ttc	gac	gtg	atc	att	atc	gga	gct	ggc	cct	gct	ggg	ctc	agg	cta	288
	Gln	Phe	Asp	Val	Ile	Ile	Ile	Gly	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Arg	Leu	
					85					90					95		
	gct	gaa	caa	gtt	tct	aaa	tat	ggg	att	aag	gta	tgt	tgt	gtt	gac	cct	336
	Ala	Glu	Gln	Val	Ser	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Val	Cys	Cys	Val	Asp	Pro	
				100				105						110			
20	tca	cca	ctc	tcc	atg	tgg	cca	aat	aat	tat	ggg	gtt	tgg	gtt	gat	gag	384
	Ser	Pro	Leu	Ser	Met	Trp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Val	Asp	Glu	
			115					120					125				
25	ttt	gag	aat	tta	gga	ctg	gaa	aat	tgt	tta	gat	cat	aaa	tgg	cct	atg	432
	Phe	Glu	Asn	Leu	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Leu	Asp	His	Lys	Trp	Pro	Met	
		130					135					140					
30	act	tgt	gtg	cat	ata	aat	gat	aac	aaa	act	aag	tat	ttg	gga	aga	cca	480
	Thr	Cys	Val	His	Ile	Asn	Asp	Asn	Lys	Thr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Arg	Pro	
	145					150					155					160	
35	tat	ggg	aga	gtt	agt	aga	aag	aag	ctg	aag	ttg	aaa	ttg	ttg	aat	agt	528
	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	Lys	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	
					165					170					175		
	tgt	gtt	gag	aac	aga	gtg	aag	ttt	tat	aaa	gct	aag	gtt	tgg	aaa	gtg	576
	Cys	Val	Glu	Asn	Arg	Val	Lys	Phe	Tyr	Lys	Ala	Lys	Val	Trp	Lys	Val	
				180					185					190			
40	gaa	cat	gaa	gaa	ttt	gag	tct	tca	att	gtt	tgt	gat	gat	ggg	aag	aag	624
	Glu	His	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Ser	Ile	Val	Cys	Asp	Asp	Gly	Lys	Lys	
			195					200					205				
45	ata	aga	ggg	agt	ttg	gtt	gtg	gat	gca	agt	ggg	ttt	gct	agt	gat	ttt	672
	Ile	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Asp	Phe	
		210					215					220					
50	ata	gag	tat	gac	agg	cca	aga	aac	cat	ggg	tat	caa	att	gct	cat	ggg	720
	Ile	Glu	Tyr	Asp	Arg	Pro	Arg	Asn	His	Gly	Tyr	Gln	Ile	Ala	His	Gly	
	225					230				235					240		
	gtt	tta	gta	gaa	gtt	gat	aat	cat	cca	ttt	gat	ttg	gat	aaa	atg	gtg	768
	Val	Leu	Val	Glu	Val	Asp	Asn	His	Pro	Phe	Asp	Leu	Asp	Lys	Met	Val	
					245					250					255		

3

	ctt atg gat tgg agg gat tct cat ttg ggt aat gag cca tat tta agg	816
	Leu Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Gly Asn Glu Pro Tyr Leu Arg	
	260 265 270	
5	gtg aat aat gct aaa gaa cca aca ttc ttg tat gca atg cca ttt gat	864
	Val Asn Asn Ala Lys Glu Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Asp	
	275 280 285	
10	aga gat ttg gtt ttc ttg gaa gag act tct ttg gtg agt cgt cct gtt	912
	Arg Asp Leu Val Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ser Arg Pro Val	
	290 295 300	
	tta tcg tat atg gaa gta aaa aga agg atg gtg gca aga tta agg cat	960
15	Leu Ser Tyr Met Glu Val Lys Arg Arg Met Val Ala Arg Leu Arg His	
	305 310 315 320	
	ttg ggg atc aaa gtg aaa agt gtt att gag gaa gag aaa tgt gtg atc	1008
	Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Val Ile Glu Glu Glu Lys Cys Val Ile	
20	325 330 335	
	cct atg gga gga cca ctt ccg cgg att cct caa aat gtt atg gct att	1056
	Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Arg Ile Pro Gln Asn Val Met Ala Ile	
	340 345 350	
25	ggt ggg aat tca ggg ata gtt cat cca tca aca ggg tac atg gtg gct	1104
	Gly Gly Asn Ser Gly Ile Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala	
	355 360 365	
30	agg agc atg gct tta gca cca gta cta gct gaa gcc atc gtc gag ggg	1152
	Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly	
	370 375 380	
	ctt ggc tca aca aga atg ata aga ggg tct caa ctt tac cat aga gtt	1200
35	Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val	
	385 390 395 400	
	tgg aat ggt ttg tgg cct ttg gat aga aga tgt gtt aga gaa tgt tat	1248
	Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr	
40	405 410 415	
	tca ttt ggg atg gag aca ttg ttg aag ctt gat ttg aaa ggg act agg	1296
	Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg	
	420 425 430	
45	aga ttg ttt gac gct ttc ttt gat ctt gat cct aaa tac tgg caa ggg	1344
	Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly	
	435 440 445	
50	ttc ctt tct tca aga ttg tct gtc aaa gaa ctt ggt tta ctc agc ttg	1392
	Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu	
	450 455 460	
	tgt ctt ttc gga cat ggc tca aac atg act agg ttg gat att gtt aca	1440

	Cys	Leu	Phe	Gly	His	Gly	Ser	Asn	Met	Thr	Arg	Leu	Asp	Ile	Val	Thr	
	465					470					475					480	
	aaa	tgt	cct	ctt	cct	ttg	gtt	aga	ctg	att	ggc	aat	cta	gca	ata	gag	1488
5	Lys	Cys	Pro	Leu	Pro	Leu	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	Ala	Ile	Glu	
				485					490					495			
	agc	ctt	tgaatgtgaa	aagtttgaa	cattttcttc	attttaattt	ctttgattat										1544
10	Ser	Leu															
	tttcatat	ttt	tctcaattgc	aaaagtgaga	taagagctac	atactgtcaa	caaataaact										1604
	actattggaa	agttaaaata	tgtgttttgtt	gtatgttatt	ctaattggaat	ggatttttga											1664
15	aa																1666
	<210>	2															
20	<211>	498															
	<212>	PRT															
25	<213>	Lycopersicon esculentum															
	<400>	2															
30	Met	Glu	Ala	Leu	Leu	Lys	Pro	Phe	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	Pro	
	1			5					10						15		
	Thr	Pro	His	Arg	Ser	Ile	Phe	Gln	Gln	Asn	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	
35				20				25						30			
	Thr	Thr	Lys	Lys	Lys	Ser	Arg	Lys	Cys	Leu	Leu	Arg	Asn	Lys	Ser	Ser	
40			35					40					45				
	Lys	Leu	Phe	Cys	Ser	Phe	Leu	Asp	Leu	Ala	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Glu	
45		50				55					60						
	Ser	Leu	Asp	Val	Asn	Ile	Ser	Trp	Val	Asp	Pro	Asn	Ser	Asn	Arg	Ala	
	65				70					75					80		
50	Gln	Phe	Asp	Val	Ile	Ile	Ile	Gly	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Arg	Leu	
					85				90						95		

5

	Ala	Glu	Gln	Val	Ser	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Val	Cys	Cys	Val	Asp	Pro	
				100					105						110		
5	Ser	Pro	Leu	Ser	Met	Trp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Val	Asp	Glu	
			115					120					125				
10	Phe	Glu	Asn	Leu	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Leu	Asp	His	Lys	Trp	Pro	Met	
		130					135					140					
15	Thr	Cys	Val	His	Ile	Asn	Asp	Asn	Lys	Thr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Arg	Pro	
	145					150					155					160	
20	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	Lys	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	
					165					170					175		
25	Cys	Val	Glu	Asn	Arg	Val	Lys	Phe	Tyr	Lys	Ala	Lys	Val	Trp	Lys	Val	
				180					185					190			
30	Glu	His	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Ser	Ile	Val	Cys	Asp	Asp	Gly	Lys	Lys	
			195					200				205					
35	Ile	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Asp	Phe	
	210						215					220					
40	Ile	Glu	Tyr	Asp	Arg	Pro	Arg	Asn	His	Gly	Tyr	Gln	Ile	Ala	His	Gly	
	225					230					235					240	
45	Val	Leu	Val	Glu	Val	Asp	Asn	His	Pro	Phe	Asp	Leu	Asp	Lys	Met	Val	
					245					250					255		
50	Leu	Met	Asp	Trp	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Gly	Asn	Glu	Pro	Tyr	Leu	Arg	
			260						265					270			
55	Val	Asn	Asn	Ala	Lys	Glu	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ala	Met	Pro	Phe	Asp	
			275					280					285				
60	Arg	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Ser	Arg	Pro	Val	
		290					295					300					
65	Leu	Ser	Tyr	Met	Glu	Val	Lys	Arg	Arg	Met	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	His	
	305					310					315					320	

5 Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Val Ile Glu Glu Glu Lys Cys Val Ile
 325 330 335

10 Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Arg Ile Pro Gln Asn Val Met Ala Ile
 340 345 350

15 Gly Gly Asn Ser Gly Ile Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala
 355 360 365

20 Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly
 370 375 380

25 Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val
 385 390 395 400

30 Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr
 405 410 415

35 Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg
 420 425 430

40 Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly
 435 440 445

45 Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu
 450 455 460

50 Cys Leu Phe Gly His Gly Ser Asn Met Thr Arg Leu Asp Ile Val Thr
 465 470 475 480

Lys Cys Pro Leu Pro Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Leu Ala Ile Glu
 485 490 495

Ser Leu

<210> 3

<211> 1608

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

5

<220>

<221> CDS

10

<222> (3)..(971)

<223>

15

<400> 3

20

ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc 47
 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile
 5 10 15

25

ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg 95
 Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu
 20 25 30

30

tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc cgc gtt gaa cta gcc 143
 Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala
 35 40 45

35

cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg 191
 Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser
 50 55 60

40

tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcg ctg gga 239
 Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly
 65 70 75

45

acc gtg cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca 287
 Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala
 80 85 90 95

ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa 335
 Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys
 100 105 110

50

cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc 383
 Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly
 115 120 125

gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac 431
 Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His
 130 135 140

atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc 479

8

	Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu	
	145 150 155	
5	ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr	527
	160 165 170 175	
10	gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His	575
	180 185 190	
15	aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu	623
	195 200 205	
20	ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly	671
	210 215 220	
25	ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu	719
	225 230 235	
30	ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu	767
	240 245 250 255	
35	gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met	815
	260 265 270	
40	aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly	863
	275 280 285	
45	ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile	911
	290 295 300	
50	cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp	959
	305 310 315	
55	tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcagcgt ggtttcacac ctcatgcctg Ser Lys Arg	1011
	320	
60	tgataagggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggctcg actggtctga	1071
65	tggccaatgg catcggccat gtctggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaagggtgatg	1131
70	cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc	1191
75	caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcggt tgtgaagcaa tgactccgcc	1251

catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta 1311
 gtgcagcaaa ctatattcac ctagggctgt tggtaggatac aggtgaggcc ttgcacattg 1371
 5 catgatgtac tcgtcatggg gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc 1431
 agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga 1491
 10 ggctcgtgcc agaaatgggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga 1551
 tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1608

15 <210> 4
 <211> 322
 <212> PRT
 20 <213> Haematococcus pluvialis

25 <400> 4
 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly
 1 5 10 15
 30 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser
 20 25 30
 35 Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg
 35 40 45
 40 Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu
 50 55 60
 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr
 65 70 75 80
 45 Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu
 85 90 95
 50 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg
 100 105 110

10

Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val
 115 120 125

5 Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met
 130 135 140

10 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu
 145 150 155 160

15 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala
 165 170 175

20 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys
 180 185 190

25 Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe
 195 200 205

30 Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe
 210 215 220

35 Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly
 225 230 235 240

40 Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val
 245 250 255

45 His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys
 260 265 270

50 Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly
 275 280 285

55 Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro
 290 295 300

60 Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser
 305 310 315 320

Lys Arg

<210> 5
 5 <211> 1125
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum
 10
 <220>
 15 <221> CDS
 <222> (20)..(946)
 <223>
 20
 <400> 5
 25 ttggtcatct ccacaatca atg gct gcc gcc gcc aga atc tcc gcc tcc tct 52
 Met Ala Ala Ala Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ser
 1 5 10
 acc tca cga act ttt tat ttc cgt cat tca ccg ttt ctt ggc cca aaa 100
 Thr Ser Arg Thr Phe Tyr Phe Arg His Ser Pro Phe Leu Gly Pro Lys
 15 20 25
 cct act tcg aca acc tca cat gtt tct cca atc tct cct ttt tct ctt 148
 Pro Thr Ser Thr Thr Ser His Val Ser Pro Ile Ser Pro Phe Ser Leu
 30 35 40
 35 aat cta ggc cca att ttg agg tct aga aga aaa ccc agt ttc act gtt 196
 Asn Leu Gly Pro Ile Leu Arg Ser Arg Arg Lys Pro Ser Phe Thr Val
 45 50 55
 40 tgc ttt gtt ctc gag gat gag aag ctg aaa cct caa ttt gac gat gag 244
 Cys Phe Val Leu Glu Asp Glu Lys Leu Lys Pro Gln Phe Asp Asp Glu
 60 65 70 75
 gct gag gat ttt gaa aag aag att gag gaa cag atc tta gct act cgc 292
 45 Ala Glu Asp Phe Glu Lys Lys Ile Glu Glu Gln Ile Leu Ala Thr Arg
 80 85 90
 ttg gcg gag aaa ctg gct agg aag aaa tcg gag agg ttt act tat ctt 340
 50 Leu Ala Glu Lys Leu Ala Arg Lys Lys Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu
 95 100 105
 gtg gct gct ata atg tct agt ttt ggg att act tct atg gct gtt atg 388
 Val Ala Ala Ile Met Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met
 110 115 120

	gct gtt tat tac aga ttt tcg tgg caa atg gag gga gga gaa gtt cct	436
	Ala Val Tyr Tyr Arg Phe Ser Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Pro	
	125 130 135	
5	gta acc gaa atg ttg ggt aca ttt gct ctc tct gtt ggt gct gct gta	484
	Val Thr Glu Met Leu Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val	
	140 145 150 155	
10	gga atg gag ttt tgg gcg aga tgg gca cac aaa gca ctg tgg cat gct	532
	Gly Met Glu Phe Trp Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala	
	160 165 170	
15	tca cta tgg cac atg cat gag tca cac cac aaa cca aga gaa gga cct	580
	Ser Leu Trp His Met His Glu Ser His His Lys Pro Arg Glu Gly Pro	
	175 180 185	
20	ttt gag ctg aac gac gtt ttc gcc ata aca aac gct gtt cca gca ata	628
	Phe Glu Leu Asn Asp Val Phe Ala Ile Thr Asn Ala Val Pro Ala Ile	
	190 195 200	
25	gcc ctc ctc aac tat ggt ttc ttc cat aaa ggc ctc att gcc gga cta	676
	Ala Leu Leu Asn Tyr Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Ile Ala Gly Leu	
	205 210 215	
30	tgc ttc ggt gct ggg cta ggg atc aca gta ttt gga atg gca tac atg	724
	Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala Tyr Met	
	220 225 230 235	
35	ttt gtt cac gat ggt ttg gtt cac aag aga ttc cca gtt gga cct gta	772
	Phe Val His Asp Gly Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly Pro Val	
	240 245 250	
40	gcc aat gta cct tat ctt agg aag gtg gct gct gct cat tcg ctt cat	820
	Ala Asn Val Pro Tyr Leu Arg Lys Val Ala Ala Ala His Ser Leu His	
	255 260 265	
45	cac tca gag aag ttc aat ggt gtc cca tat ggc ttg ttc ttc gga cct	868
	His Ser Glu Lys Phe Asn Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Phe Gly Pro	
	270 275 280	
50	aag gaa ctg gaa gaa gta gga ggg acg gaa gag ttg gaa aag gaa gtg	916
	Lys Glu Leu Glu Glu Val Gly Gly Thr Glu Glu Leu Glu Lys Glu Val	
	285 290 295	
55	ata cga agg acg aga ctt tcg aaa gga tca tgaacgattg ttcataaaca	966
	Ile Arg Arg Thr Arg Leu Ser Lys Gly Ser	
	300 305	
60	tagaatgtca ttttacactt cttatcaatg aggaaggggtg atttttgatg tatttgatag	1026
	tagagaaaaa tgtagctctc ttgatgaaat gaatttgatg ttatgtaggc tcttcttatt	1086
	cagtaagatt ttttcttttt tttgatctcg tgccgaatt	1125

<210> 6
 5 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Lycopersicon esculentum
 10
 <400> 6
 15 Met Ala Ala Ala Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ser Thr Ser Arg Thr Phe
 1 5 10 15
 Tyr Phe Arg His Ser Pro Phe Leu Gly Pro Lys Pro Thr Ser Thr Thr
 20 20 25 30
 Ser His Val Ser Pro Ile Ser Pro Phe Ser Leu Asn Leu Gly Pro Ile
 25 35 40 45
 Leu Arg Ser Arg Arg Lys Pro Ser Phe Thr Val Cys Phe Val Leu Glu
 50 55 60
 30 Asp Glu Lys Leu Lys Pro Gln Phe Asp Asp Glu Ala Glu Asp Phe Glu
 65 70 75 80
 35 Lys Lys Ile Glu Glu Gln Ile Leu Ala Thr Arg Leu Ala Glu Lys Leu
 85 90 95
 40 Ala Arg Lys Lys Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu Val Ala Ala Ile Met
 100 105 110
 Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met Ala Val Tyr Tyr Arg
 45 115 120 125
 Phe Ser Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Pro Val Thr Glu Met Leu
 130 135 140
 50 Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Gly Met Glu Phe Trp
 145 150 155 160

14

Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala Ser Leu Trp His Met
 165 170 175

5 His Glu Ser His His Lys Pro Arg Glu Gly Pro Phe Glu Leu Asn Asp
 180 185 190

10 Val Phe Ala Ile Thr Asn Ala Val Pro Ala Ile Ala Leu Leu Asn Tyr
 195 200 205

15 Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Ile Ala Gly Leu Cys Phe Gly Ala Gly
 210 215 220

Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly
 225 230 235 240

20 Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly Pro Val Ala Asn Val Pro Tyr
 245 250 255

25 Leu Arg Lys Val Ala Ala Ala His Ser Leu His His Ser Glu Lys Phe
 260 265 270

30 Asn Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Phe Gly Pro Lys Glu Leu Glu Glu
 275 280 285

35 Val Gly Gly Thr Glu Glu Leu Glu Lys Glu Val Ile Arg Arg Thr Arg
 290 295 300

Leu Ser Lys Gly Ser
 305

40

<210> 7

<211> 1830

45

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

50

<220>

<221> CDS

15

<222> (141)..(1691)

<223>

5

<400> 7

```

ggcacgagggc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggtga gagacactcc aatccaaaca      60
10 gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa      120
    agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca      173
        Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr
            1             5             10
15 atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg      221
    Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr
            15             20             25
20 aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa      269
    Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln
            30             35             40
25 gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg      317
    Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu
            45             50             55
30 ctt ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc      365
    Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser
            60             65             70             75
35 cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt      413
    Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser
            80             85             90
40 aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt      461
    Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu
            95             100             105
45 gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc      509
    Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile
            110             115             120
50 ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa      557
    Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu
            125             130             135
    ttt ata ggt ctt gga ctt gag ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat      605
    Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp
            140             145             150             155
    act gta gta tat ctt gat gac aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc      653
    Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala
            160             165             170

```

	tat gga cga gtt agt cgt gat tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg	701
	Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg	
	175 180 185	
5	tgc atg gag tca ggc gtt tca tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att	749
	Cys Met Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile	
	190 195 200	
10	act gaa gct cca aat ggc cta agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc	797
	Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile	
	205 210 215	
15	aca att cca tgc agg ctt gct act gtc gct tct gga gca gct tct gga	845
	Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly	
	220 225 230 235	
20	aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca	893
	Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr	
	240 245 250	
25	gct tat ggt ata gag gtt gag gtt gaa agc ata ccc tat gat cca agc	941
	Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser	
	255 260 265	
30	cta atg gtt ttc atg gat tat aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa	989
	Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln	
	270 275 280	
35	tca cta gaa gca caa tat cca aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct	1037
	Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser	
	285 290 295	
40	cca act aaa gta ttc ttt gag gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc	1085
	Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala	
	300 305 310 315	
45	atg cct ttt gag tta ttg aag aca aaa ctc atg tca aga tta aag act	1133
	Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr	
	320 325 330	
50	atg ggg atc cga ata acc aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat att	1181
	Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile	
	335 340 345	
55	cca gta ggt gga tcc tta cca aat acc gag caa aag aac ctt gca ttt	1229
	Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe	
	350 355 360	
60	ggg gct gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg gtt gta	1277
	Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val	
	365 370 375	
65	aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca aag att	1325

17

Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile
 380 385 390 395

5 tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat cat gga aga tac aca 1373
 Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr
 400 405 410

10 acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg 1421
 Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg
 415 420 425

15 aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag 1469
 Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln
 430 435 440

atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg 1517
 Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu
 445 450 455

20 ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca tca act 1565
 Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr
 460 465 470 475

25 gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc 1613
 Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser
 480 485 490

30 ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga 1661
 Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly
 495 500 505

35 aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataactctag tcgcgatcag 1711
 Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile
 510 515

ttttagattat aggcacatct tgcatatata tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct 1771

40 tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct tggggtaatg ctgatgaagt attttctgg 1830

<210> 8

<211> 516

45 <212> PRT

<213> Tagetes erecta

50 <400> 8

Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr
 1 5 10 15

Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys
 20 25 30
 5

Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu
 35 40 45
 10

Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met
 50 55 60
 15

Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu
 65 70 75 80
 20

Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp
 85 90 95
 25

Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu
 100 105 110
 30

Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro
 115 120 125
 35

Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly
 130 135 140
 40

Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu
 145 150 155 160
 45

Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser
 165 170 175
 50

Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly
 180 185 190
 55

Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn
 195 200 205
 60

Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg
 210 215 220

19

Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr
 225 230 235 240

5 Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu
 245 250 255

10 Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met
 260 265 270

15 Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln
 275 280 285

Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe
 290 295 300

20 Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu
 305 310 315 320

25 Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile
 325 330 335

30 Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser
 340 345 350

35 Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser
 355 360 365

Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu
 370 375 380

40 Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn
 385 390 395 400

45 Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys
 405 410 415

50 Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala
 420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly
 435 440 445

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp
 450 455 460

5

Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe
 465 470 475 480

10

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu
 485 490 495

15 Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala
 500 505 510

20 Tyr Leu Thr Ile
 515

<210> 9

25 <211> 358

<212> DNA

30 <213> Tagetes erecta

<220>

35 <221> Sense Promotor

<222> (1)..(358)

40 <223>

<400> 9
 45 aagcttaccg atagtaaaat cgtagttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60
 gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtggttgaa tgagggttaa 120
 tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180
 50 cggccaatat agtgatgcca cgtagaaaaa ggtaagtga aacatacaac gtggctttaa 240
 aagatggctt ggctgctaact caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300
 tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaaggttg tttgttggtg ttgtcgac 358

<210> 10

5 <211> 445

<212> DNA

10 <213> *Tagetes erecta*

<220>

15 <221> Sense Fragment

<222> (1)..(445)

20 <223>

<400> 10

25 aagcttgcac gaggcaaagc aaagggttggt tgttggttggt gttgagagac actccaatcc 60

aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcggtc ctaacaacag caacgaagaa 120

gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180

30 ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240

caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300

35 gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaatacaa cagaataagt ccatggatgc 360

acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420

ctgtatactg gatttggttg tcgac 445

40 <210> 11

<211> 446

45 <212> DNA

<213> *Tagetes erecta*

50 <220>

<221> Antisense Fragment

<222> (1) .. (446)

<223>

5

<400> 11
gaattcgac gaggcaaagc aaagggtgtt tgttggtgtt gttgagagac actccaatcc 60
10 aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa 120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180
15 ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300
gaaagccggg ggatcggagc tgctttttgt tcaaatgcaa cagaataagt ccatggatgc 360
20 acagtctagc ctatcccaa agctccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420
ctgtatactg gatttggttg gatcct 446

25 <210> 12

<211> 393

<212> DNA

30

<213> Tagetes erecta

35 <220>

<221> Sense Fragment

<222> (1) .. (393)

40

<223>

45 <400> 12
aagcttttga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggacccgca cattcttccg 60
gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtgggggttt cttggatctt cgttatcatc 120
50 aactgacttg ataatatattg cgttttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat 180
gggtctgggt agacatttgc tttctgacc gacaggagga acaatgttaa aagcgatatc 240
cacgatataa ataactctag tcgcgatcag tttagattat aggcacatct tgcatatata 300

23

tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct 360
tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac 393
5

<210> 13

<211> 397

10

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

15

<220>

<221> Antisense Fragment

20

<222> (1)..(397)

<223>

25

<400> 13

gaattctctt tggattagca ctgattgtcc agatggatat tgaggggacc cgcacattct 60

30 tccggacttt cttccgcttg cccacatgga tgtggtgggg gtttcttgga tcttcgttat 120

catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga 180

gaatgggtct ggtagacat ttgctttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt 240

35 atctcacgat ataaataact ctagtcgcga tcagtttaga ttataggcac atcttgcata 300

tatatatgta taaaccttat gtgtgctgta tccttacatc aacacagtca ttaattgtat 360

40 ttcttggggg aatgctgatg aagtattttc tggatcc 397

<210> 14

45 <211> 358

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

50

<220>

<221> Sense Promotor

<222> (1)..(358)

5 <223>

<400> 14

10 aagcttaccg atagtaaaat cgtaggttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60

gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgagggttaa 120

15 tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180

cgccaatat agtgatgcca cgtagaaaaa ggtaagtga aacatacaac gtggctttaa 240

aagatggctt ggctgctaact caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300

20 tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaagggtt tttgttgttg ttgtcgac 358

<210> 15

25 <211> 361

<212> DNA

30 <213> Tagetes erecta

<220>

35 <221> Antisense Promotor

<222> (1)..(361)

40 <223>

<400> 15

45 ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60

taggctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgaggtt 120

aaatggagtt taattaaaat aaagagaaga gaaagattaa gagggatgatg gggatattaa 180

50 agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt 240

taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca taccctatcc attcaaattc 300

aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttgatc 360

c

361

5 <210> 16
 <211> 332
 <212> DNA
 10 <213> *Tagetes erecta*

 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(330)
 20 <223>

 25 <400> 16
 aag ctt gca cga gcc tct ctc tat ttt tac act tca atg gcg gca gca 48
 Lys Leu Ala Arg Ala Ser Leu Tyr Phe Tyr Thr Ser Met Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 30 att gct gtc cct tgt agc tca aga cca ttt ggc tta ggt cga atg cgg 96
 Ile Ala Val Pro Cys Ser Ser Arg Pro Phe Gly Leu Gly Arg Met Arg
 20 25 30
 35 tta ctt ggt cat aaa ccc aca acc ata act tgt cac ttc ccc ttt tct 144
 Leu Leu Gly His Lys Pro Thr Thr Ile Thr Cys His Phe Pro Phe Ser
 35 40 45
 40 ttt tct atc aaa tca ttt acc cca att gtt agg ggc aga aga tgt act 192
 Phe Ser Ile Lys Ser Phe Thr Pro Ile Val Arg Gly Arg Arg Cys Thr
 50 55 60
 45 gtt tgt ttt gtt gcc ggt ggc gac agt aat agt aac agt aat aat aat 240
 Val Cys Phe Val Ala Gly Gly Asp Ser Asn Ser Asn Ser Asn Asn Asn
 65 70 75 80
 45 agt gac agt aat agt aat aat ccg ggt ctg gat tta aac ccg gcg gtt 288
 Ser Asp Ser Asn Ser Asn Asn Pro Gly Leu Asp Leu Asn Pro Ala Val
 85 90 95
 50 atg aac cgt aac cgt ttg gtt gaa gaa aaa atg gag agg tcg ac 332
 Met Asn Arg Asn Arg Leu Val Glu Glu Lys Met Glu Arg Ser
 100 105 110

26

<210> 17

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Tagetes erecta

10

<400> 17

Lys Leu Ala Arg Ala Ser Leu Tyr Phe Tyr Thr Ser Met Ala Ala Ala
1 5 10 15

15

Ile Ala Val Pro Cys Ser Ser Arg Pro Phe Gly Leu Gly Arg Met Arg
20 25 30

20

Leu Leu Gly His Lys Pro Thr Thr Ile Thr Cys His Phe Pro Phe Ser
35 40 45

25

Phe Ser Ile Lys Ser Phe Thr Pro Ile Val Arg Gly Arg Arg Cys Thr
50 55 60

30

Val Cys Phe Val Ala Gly Gly Asp Ser Asn Ser Asn Ser Asn Asn Asn
65 70 75 80

Ser Asp Ser Asn Ser Asn Asn Pro Gly Leu Asp Leu Asn Pro Ala Val
85 90 95

35

Met Asn Arg Asn Arg Leu Val Glu Glu Lys Met Glu Arg Ser
100 105 110

40

<210> 18

<211> 332

45 <212> DNA

<213> Tagetes erecta

50

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(332)

<223> b-Hydroxylase Sense-Fragment

5

<400> 18
aagcttgac gagcctctct ctattttttac acttcaatgg cggcagcaat tgctgtccct 60
10 tgtagctcaa gaccatttgg cttagggtcga atgcgggttac ttggtcataa acccacaacc 120
ataacttgctc acttccccctt ttcttttttct atcaaatacat ttaccccaat tgttaggggc 180
agaagatgta ctgtttggtt tgttgccggt ggcgacagta atagtaacag taataataat 240
15 agtgacagta atagtaataa tccgggtctg gatttaaacc cggcgggttat gaaccgtaac 300
cgtttggttg aagaaaaaat ggagaggtcg ac 332

20

<210> 19

<211> 332

25

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

30

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (1)..(332)

<223> b-Hydroxylase Antisense-Fragment

40

<400> 19
gaattcggca cgagcctctc tctattttta cacttcaatg gcggcagcaa ttgctgtccc 60
ttgtagctca agaccatttg gcttaggtcg aatgcgggta cttggtcata aaccacaac 120
45 cataacttgt cacttccccct tttctttttc tatcaaataca ttaccccaa ttgtagggg 180
cagaagatgt actgtttggt ttggtgccgg tggcgacagt aatagtaaca gtaataataa 240
tagtgacagt aatagtaata atccgggtct ggatttaaac ccggcgggta tgaaccgtaa 300
ccgtttggtt gaagaaaaaa tggagaggat cc 332

28

<210> 20
<211> 19
5 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
10
<220>
<221> Primer
15 <222> (1)..(19)
<223>
20
<400> 20
tgccaaagta actctttat 19
25 <210> 21
<211> 19
<212> DNA
30 <213> Künstliche Sequenz
35 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(19)
40 <223>
45 <400> 21
aggtgcatga ccaagtaac 19
50
<210> 22
<211> 1033
<212> DNA

<213> *Lycopersicon esculentum*

5 <220>

<221> Promotor

10 <222> (1)..(1033)

<223>

15 <400> 22
aggtgcatga ccaagtaaca atttgattcc tttccagcat aacgtcatgt tggttgcaaa 60
aagaaggcaa agtagagcaa gcaagcaagc aaagcatttt tcttatttta tattttgttg 120
20 cggattccac caccacttg aaaaattgac atgtcacaat gatttcgtat cctagtcttt 180
tattatttaa cactctcaca atcccattac tctacacctc tttcattaag tcaacacacg 240
gttttcaaaa atccactacc ctcccaccac ctagaatctt ttgttaccta ccaacaccct 300
25 cctttgttct ctttatatat tggccaact aatcaataa gggaaagcat ccttttggtt 360
ggaggaattg ctttcattct cactctttgt gtgttgatca atggactagc taataacaag 420
30 ttcctcctct atatatattca aaagaatgga acagaaacat aaacgaaaga cagagtacct 480
gatgttgatg attcattgtc tgtctggagc tcccaaagc cttttatgct tacatattca 540
taaccaacaa cggctattaa ttataaacca aaaacacgaa ataagtttgt agcaaagtga 600
35 aattaggaat cttggagatg gatccattag tagtaggata ataggatatg atggaatttg 660
gttggggaac agtgataact tacgcttgct tccggcgccg ggaaagtgg aaaacctaca 720
40 aagtacagaa atggatctgg gccttgaagt gggcttttta ttaaagaaaa aaatacatct 780
ccgttatcaa tcaccatctt cttctatcta caaattaaag aaggtaacaa cagaacgtgg 840
tggatcatgt ggtaggcat taattatttg ctttgtttcg ccgttttggt aacacacaga 900
45 cacagttccg gtaagagctt ttgcagccac tctttatagt tatttagaat tggcgatcga 960
atcaatctca ctccctccct cccttaagtc ttgttgaatc tgctgaattg ttttataaag 1020
50 agttactttg gca 1033

<210> 23

30

<211> 18

<212> DNA

5 <213> Künstliche Sequenz

<220>

10 <221> Primer

<222> (1)..(18)

15 <223>

<400> 23

20 atggaagctc ttctcaag 18

<210> 24

25 <211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

30 <220>

35 <221> Primer

<222> (1)..(22)

<223>

40

<400> 24

45 ctattgctag attgccaatc ag 22

<210> 25

<211> 28

50 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

10

<400> 25

gagctcactc actgatttcc attgcttg

15

28

<210> 26

<211> 37

20

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

25

<220>

<221> Primer

30

<222> (1)..(37)

<223>

35

<400> 26

cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

40

<210> 27

<211> 34

45

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

50

<220>

<221> Primer

32

<222> (1)..(34)

<223>

5

<400> 27

atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

10

<210> 28

<211> 25

15

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

20

<220>

<221> Primer

25

<222> (1)..(25)

<223>

30

<400> 28

taagcttttt gttgaagaga tttagg

25

35

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

40

<213> kuenstliche Sequenz

45

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(23)

50

<223>

33

<400> 29
gaaaatactt catcagcatt acc 23

5 <210> 30
<211> 28
<212> DNA
10 <213> kuenstliche Sequenz

15 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
20 <223>

25 <400> 30
gtcgactacg taagtttctg cttctacc 28

30 <210> 31
<211> 26
<212> DNA
35 <213> kuenstliche Sequenz

40 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
45 <223>

50 <400> 31
ggatccggtg atacctgcac atcaac 26
<210> 32

34

<211> 28

<212> DNA

5 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

10 <221> Primer

<222> (1)..(28)

15 <223>

<400> 32

20 aagcttgcac gaggcaaagc aaagggttg 28

<210> 33

25 <211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

30

<220>

35 <221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

40

<400> 33

45 gtcgacaacc aaatccagta tacagttac 29

<210> 34

<211> 30

50 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(30)

10 <223>

<400> 34
aggatccaac caaatccagt atacagttac 30

15 <210> 35

<211> 28

20 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

25 <220>

<221> Primer

30 <222> (1)..(28)

<223>

35 <400> 35
gaattcgcac gaggcaaagc aaaggttg 28

40 <210> 36

<211> 25

45 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

50 <220>

<221> Primer

36

<222> (1)..(25)

<223>

5

<400> 36

aagcttttga ttagcactga ttgtc

25.

10

<210> 37

<211> 29

15

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

20

<220>

<221> Primer

25

<222> (1)..(29)

<223>

30

<400> 37

gtcgacagaa aatacttcat cagcattac

29

35

<210> 38

<211> 29

<212> DNA

40

<213> kuenstliche Sequenz

45

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

50

<223>

37

<400> 38
ggatccagaa aatacttcat cagcattac 29

5 <210> 39
<211> 27
<212> DNA
10 <213> kuenstliche Sequenz

15 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(27)
20 <223>

25 <400> 39
gaattctctt tggattagca ctgattg 27

30 <210> 40
<211> 23
<212> DNA
35 <213> kuenstliche Sequenz

40 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(23)
45 <223>

50 <400> 40
cgccttgtat ctgtttggat tgg 23
<210> 41

<211> 24

<212> DNA

5 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

10 <221> Primer

<222> (1)..(24)

15 <223>

<400> 41

20 ctaacaatca atgagtatga gaggc 24

<210> 42

25 <211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

30

<220>

35 <221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

40

<400> 42

45 agagcaaggc cagcaggacc acaacc 26

<210> 43

<211> 26

50 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

10

<400> 43
ccttgggagc ttttgggata ggctag 26

15

<210> 44

<211> 26

20 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

25

<220>

<221> Primer

30 <222> (1)..(26)

<223>

35

<400> 44
tcacgccttg tatctgtttg gattgg 26

40

<210> 45

<211> 15

45 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

50

<220>

<221> Primer

40

<222> (1) .. (15)

<223>

5

<400> 45
gtcgcgagtatg gagtt

15

10

<210> 46

<211> 28

15 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

20

<220>

<221> Primer

25 <222> (1) .. (28)

<223>

30

<400> 46
aagcttaccg atagtaaaat cgtttagtt

28

35 <210> 47

<211> 31

<212> DNA

40

<213> kuenstliche Sequenz

45 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (31)

50

<223>

41

<400> 47
ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt t

31

5 <210> 48

<211> 28

<212> DNA

10

<213> kuenstliche Sequenz

15 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

20

<223>

25 <400> 48
gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc

28

30 <210> 49

<211> 28

<212> DNA

35 <213> kuenstliche Sequenz

40 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

45 <223>

50 <400> 49
ggatccaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 50

42

<211> 22

<212> DNA

5 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

10

<221> Primer

<222> (1)..(22)

15 <223>

<400> 50

20 gagctctaca aattaggggtt ac

22

<210> 51

25 <211> 23

<212> DNA

30 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

35 <221> Primer

<222> (1)..(23)

<223>

40

<400> 51

45 aagcttatta tttccaaatt ccg

23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/09101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 C12N9/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 88169 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 22 November 2001 (2001-11-22) page 13, line 24 -page 14, line 13	1-43
X	WO 00 32788 A (HANSENS LAB) 8 June 2000 (2000-06-08) cited in the application page 5, line 27 - line 28 page 7, line 24 -page 8, line 6 page 12, line 16 -page 13, line 2 page 18, line 31 -page 19, line 27 page 20, line 12 - line 18; examples 7-10,13,16 --- -/--	1-43

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 December 2003

Date of mailing of the international search report

23/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schönwasser, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/09101

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DHARMAPURI S ET AL: "Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 519, no. 1-3, 22 May 2002 (2002-05-22), pages 30-34, XP004356816 ISSN: 0014-5793 cited in the application table 1	1-14, 23-34, 36-42
P,X	EP 1 323 825 A (ENEA ENTE NUOVE TEC ;BIOGEN S R L (IT)) 2 July 2003 (2003-07-02) cited in the application '11!-'27!,'30!	8-14, 23-29, 34,37-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03 09101

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-7, 22-33 and 36-43 (all in part)

Method for producing beta-carotenoids by cultivation of plants with increased beta-cyclase activity; correspondingly genetically modified plants and use of said plants or zeaxanthin-containing extracts.

1.1 Claims 1-14, 30-34 and 36-43 (all in part)

Method for producing beta-carotenoids by cultivation of plants with increased beta-cyclase activity and also increased hydroxylase activity; correspondingly genetically modified plants and use of said plants or zeaxanthin-containing extracts.

1.2 Claims 1-18 and 21-43 (all in part)

Method for producing beta-carotenoids by cultivation of plants with increased beta-cyclase activity and also increased hydroxylase activity and reduced epsilon-cyclase activity; correspondingly genetically modified plants and use of said plants or zeaxanthin-containing extracts.

1.3 Claims 1-16 and 19-43 (all in part)

Method for producing beta-carotenoids by cultivation of plants with increased beta-cyclase activity and also increased hydroxylase activity and reduced endogenous beta-hydroxylase activity; correspondingly genetically modified plants and use of said plants or zeaxanthin-containing extracts.

1.4 Claims 1-43 (all in part)

Method for producing beta-carotenoids by cultivation of plants with increased beta-cyclase activity and also increased hydroxylase activity and reduced epsilon-cyclase activity and reduced endogenous beta-hydroxylase activity; correspondingly genetically modified plants and use of said plants or zeaxanthin-containing extracts.

1.5 Claims 1-7, 15-18, 21-33 and 35-43 (all in part)

Method for producing beta-carotenoids by cultivation of plants with increased beta-cyclase activity and reduced epsilon-cyclase activity; correspondingly genetically modified plants and use of said plants or zeaxanthin-containing extracts.

1.6 Claims 1-7, 15, 16, 19-33 and 35-43 (all in part)

Method for producing beta-carotenoids by cultivation of plants with increased beta-cyclase activity and reduced endogenous beta-hydroxylase activity; correspondingly genetically modified plants and use of said plants or zeaxanthin-containing extracts.

1.7 Claims 1-7, 15-33 and 35-43 (all in part)

Method for producing beta-carotenoids by cultivation of plants with increased beta-cyclase activity and reduced epsilon-cyclase activity and reduced endogenous beta-hydroxylase activity; correspondingly genetically modified plants and use of said plants or zeaxanthin-containing extracts.

Please note that although the inventions specified under point 1 are not necessarily linked by a common inventive concept, it was possible to carry out a full search without entailing added effort that would have justified an additional search fee.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/09101

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0188169	A	22-11-2001	AU 6144701 A WO 0188169 A2	26-11-2001 22-11-2001
WO 0032788	A	08-06-2000	US 6232530 B1 AU 1503000 A WO 0032788 A2 EP 1137782 A2 JP 2002531094 T PL 348454 A1	15-05-2001 19-06-2000 08-06-2000 04-10-2001 24-09-2002 20-05-2002
EP 1323825	A	02-07-2003	IT RM20010670 A1 EP 1323825 A2	09-05-2003 02-07-2003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/82 C12N9/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, SEQUENCE SEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01 88169 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 22. November 2001 (2001-11-22) Seite 13, Zeile 24 -Seite 14, Zeile 13 ---	1-43
X	WO 00 32788 A (HANSENS LAB) 8. Juni 2000 (2000-06-08) in der Anmeldung erwähnt Seite 5, Zeile 27 - Zeile 28 Seite 7, Zeile 24 -Seite 8, Zeile 6 Seite 12, Zeile 16 -Seite 13, Zeile 2 Seite 18, Zeile 31 -Seite 19, Zeile 27 Seite 20, Zeile 12 - Zeile 18; Beispiele 7-10,13,16 --- -/--	1-43



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Dezember 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/12/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schönwasser, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DHARMAPURI S ET AL: "Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 519, Nr. 1-3, 22. Mai 2002 (2002-05-22), Seiten 30-34, XP004356816 ISSN: 0014-5793 in der Anmeldung erwähnt Tabelle 1	1-14, 23-34, 36-42
P, X	EP 1 323 825 A (ENEA ENTE NUOVE TEC ; BIOGEN S R L (IT)) 2. Juli 2003 (2003-07-02) in der Anmeldung erwähnt '11!-'27!', '30!	8-14, 23-29, 34, 37-42

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/09101

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-7,22-33,36-43 (alle partiell)

Verfahren zur Herstellung von beta-Carotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen mit erhöhter beta-Cyclase Aktivität; entsprechend genetisch veränderte Pflanzen sowie Verwendung dieser Pflanzen oder zeaxanthinhaltiger Extrakte.

1.1. Ansprüche: 1-14,30-34,36-43 (alle partiell)

Verfahren zur Herstellung von beta-Carotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen mit erhöhter beta-Cyclase Aktivität und zusätzlich erhöhter Hydroxylase Aktivität; entsprechend genetisch veränderte Pflanzen sowie Verwendung dieser Pflanzen oder zeaxanthinhaltiger Extrakte.

1.2. Ansprüche: 1-18,21-43 (alle partiell)

Verfahren zur Herstellung von beta-Carotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen mit erhöhter beta-Cyclase Aktivität und zusätzlich erhöhter Hydroxylase Aktivität sowie reduzierter epsilon-Cyclase Aktivität; entsprechend genetisch veränderte Pflanzen sowie Verwendung dieser Pflanzen oder zeaxanthinhaltiger Extrakte.

1.3. Ansprüche: 1-16,19-43 (alle partiell)

Verfahren zur Herstellung von beta-Carotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen mit erhöhter beta-Cyclase Aktivität und zusätzlich erhöhter Hydroxylase Aktivität sowie reduzierter endogener beta-Hydroxylase Aktivität; entsprechend genetisch veränderte Pflanzen sowie Verwendung dieser Pflanzen oder zeaxanthinhaltiger Extrakte.

1.4. Ansprüche: 1-43 (alle partiell)

Verfahren zur Herstellung von beta-Carotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen mit erhöhter beta-Cyclase Aktivität und zusätzlich erhöhter Hydroxylase Aktivität sowie reduzierter epsilon-Cyclase und reduzierter endogener beta-Hydroxylase Aktivität; entsprechend genetisch veränderte Pflanzen sowie Verwendung dieser Pflanzen oder zeaxanthinhaltiger Extrakte.

1.5. Ansprüche: 1-7,15-18,21-33,35-43 (alle partiell)

Verfahren zur Herstellung von beta-Carotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen mit erhöhter beta-Cyclase

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Aktivität sowie reduzierter epsilon-Cyclase Aktivität; entsprechend genetisch veränderte Pflanzen sowie Verwendung dieser Pflanzen oder zeaxanthinhaltiger Extrakte.

- 1.6. Ansprüche: 1-7,15,16,19-33,35-43 (alle partiell)
Verfahren zur Herstellung von beta-Carotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen mit erhöhter beta-Cyclase Aktivität sowie reduzierter endogener beta-Hydroxylase Aktivität; entsprechend genetisch veränderte Pflanzen sowie Verwendung dieser Pflanzen oder zeaxanthinhaltiger Extrakte.

- 1.7. Ansprüche: 1-7,15-33,35-43 (alle partiell)
Verfahren zur Herstellung von beta-Carotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen mit erhöhter beta-Cyclase Aktivität sowie reduzierter epsilon-Cyclase und reduzierter endogener beta-Hydroxylase Aktivität; entsprechend genetisch veränderte Pflanzen sowie Verwendung dieser Pflanzen oder zeaxanthinhaltiger Extrakte.

Bitte zu beachten daß für alle unter Punkt 1 aufgeführten Erfindungen, obwohl diese nicht unbedingt durch ein gemeinsames erfinderisches Konzept verbunden sind, ohne Mehraufwand der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, eine vollständige Recherche durchgeführt werden konnte.

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09101

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0188169	A	22-11-2001	AU	6144701 A	26-11-2001
			WO	0188169 A2	22-11-2001
WO 0032788	A	08-06-2000	US	6232530 B1	15-05-2001
			AU	1503000 A	19-06-2000
			WO	0032788 A2	08-06-2000
			EP	1137782 A2	04-10-2001
			JP	2002531094 T	24-09-2002
			PL	348454 A1	20-05-2002
EP 1323825	A	02-07-2003	IT	RM20010670 A1	09-05-2003
			EP	1323825 A2	02-07-2003